

2m11.3508.7

Université de Montréal

Capacité de rétention du récepteur CD4 par la protéine Vpu du VIH-1 chez des isolats primaires
et implications au niveau de l'infectivité des particules virales

Par
Nathalye Belzile

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître es science (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Janvier 2007

© Nathalye Belzile, 2007



W

H

U58

2007

V.088

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Capacité de rétention du récepteur CD4 par la protéine Vpu du VIH-1 chez des isolats primaires
et implications au niveau de l'infectivité des particules virales

Présenté par :

Nathalye Belzile

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Caroline Alfieri, présidente-rapporteure

Éric A. Cohen, directeur de recherche

François Coutlée, membre du jury



Résumé

Il est connu que les cellules exprimant le récepteur CD4 à leur surface sont les principales cibles du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Suite à l'infection, le VIH-1 induit une réduction rapide et marquée du niveau de récepteur CD4 à la surface des cellules infectées. En effet, trois protéines virales (Nef, Env, Vpu) ont pour effet de diminuer l'expression du récepteur viral à la surface des cellules, suggérant une convergence de fonction. Des résultats récents de notre laboratoire ainsi que d'autres groupes indiquent que l'accumulation du récepteur viral à la surface des cellules infectées conduit à une incorporation non spécifique de CD4 dans les particules virales néo-synthétisées, et exerce ainsi un effet négatif sur l'infectivité virale. Vpu est une phosphoprotéine transmembranaire dont les principales fonctions biologiques sont l'augmentation de la relâche des particules virales ainsi que la régulation négative du récepteur CD4 néo-synthétisé suite à l'induction de la dégradation du CD4 au niveau du réticulum endoplasmique (RE) via le système ubiquitine-protéasome. Ce phénomène nécessite une interaction avec β -TrCP, qui fait partie du complexe Ubiquitine ligase (E3) SCF ^{β -TrCP}. Il a été observé au laboratoire que certains isolats primaires avaient une faible capacité à induire la dégradation du CD4 par ce système, malgré le maintien de leur capacité à lier la molécule CD4 et β -TrCP. Il serait donc possible que Vpu soit en mesure de réguler négativement le CD4 par deux voies différentes afin de permettre la formation de particules virales infectieuses et que cette voie de rétention serait privilégiée chez certains isolats primaires où la fonction de dégradation serait inefficace. Ceci pourrait être accompli en augmentant l'affinité et l'avidité de Vpu pour le CD4 et/ou en augmentant la stabilité de Vpu. Afin de démontrer que certains des variants de Vpu sont en mesure de retenir de façon intracellulaire le CD4 dans le but de compenser une capacité réduite à induire la dégradation de celui-ci, des expériences de marquage métabolique, ainsi que des expériences de marquage du CD4 total et en surface en cytométrie de flux ont été effectuées. Nous avons ainsi démontré que malgré une capacité de dégradation du CD4 peu efficace, certains isolats sont en mesure de diminuer fortement l'expression de CD4 à la surface des cellules. Nous n'avons pas été en mesure de déterminer hors de tout doute si cette capacité de rétention intracellulaire du CD4 par ces variants impliquait une augmentation de la stabilité de la protéine. Nous avons toutefois montré que les particules formées suite à la co-transfection d'un provirus Vpu⁻ avec les expresseurs de Vpu provenant d'isolats primaires ayant une capacité de rétention intracellulaire du CD4 ne sont pas plus infectieuses que celles formées en absence de Vpu. L'analyse des virions ainsi produits a démontré que pour certains isolats, l'incorporation de CD4 au sein des particules virales, malgré un phénomène de rétention, serait responsable de la diminution de l'infectivité. Pour d'autres, une diminution de l'incorporation de CD4 couplé à une diminution de l'enveloppe dans les virions nous porte à croire qu'il serait possible qu'il y ait formation d'un complexe entre Vpu, CD4 et l'enveloppe au niveau du RE. Puisque la stabilité de Vpu provenant de ce variant semble être augmenté lors de son transport normal, nous croyons qu'il serait possible

que ce complexe soit entraîné dans des compartiments cellulaires autres que le RE. Ainsi, ce variant de Vpu pourrait être dégradé de manière tardive dans d'autres compartiments cellulaires, tel que les lysosomes. Cependant, des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

Mots clés : VIH-1, Vpu, régulation négative du CD4, isolats primaires, infectivité virale.

Summary

CD4 expressing cells constitute the major target cell type for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Following infection of CD4-positive cells, HIV-1 induces a rapid and pronounced down-regulation of the CD4 receptor at the cell surface. Three viral proteins (Nef, Env, Vpu) play a primary or secondary role in down-regulating surface expression of the viral receptor, suggesting a convergence of function. Recent studies from our laboratory and others have shown that CD4 accumulation at the surface of infected cells leads to non-specific incorporation of CD4 into newly-synthesized viral particles, thereby exerting a negative effect on viral infectivity. Vpu is a transmembrane phosphoprotein whose main biological functions are to increase viral particle release and to down-regulate the newly-synthesized CD4 receptors through ubiquitin-proteasome pathway degradation in the endoplasmic reticulum (ER). This phenomenon requires an interaction with β -TrCP, which is part of the ubiquitin ligase (E3) complex SCF ^{β -TrCP}. Previous studies in our laboratory indicated that certain primary isolates inefficiently degrade CD4 through this pathway, while they conserve the ability to bind CD4 and β -TrCP. One can deduce, therefore, that Vpu down-regulates CD4 via two distinct pathways, and that CD4 retention might be preferred by primary isolates which have an inefficient CD4 degradation mechanism. This could be accomplished by an increase in the affinity and avidity of Vpu for CD4 and/or by an increase in Vpu's stability. In order to determine whether certain Vpu variants are able to retain CD4 intracellularly to compensate for its poor degradation, metabolic labelling experiments and total/surface CD4 labelling by FACS were performed. These experiments demonstrated that, in spite of a weak ability to degrade CD4, certain isolates were capable of inducing significant down-regulation of cell-surface CD4. Whether this intracellular CD4 retention ability involves an increase in the stability of the Vpu protein could not be established with certainty. However, our results demonstrated that the infectivity of viral particles produced by co-transfection of a provirus Vpu⁻ with expressors of Vpu from primary isolates were not more infectious than those produced in the absence of Vpu. Analysis of viral particles produced under such conditions indicated that, for certain primary isolates, CD4 incorporation into virions, even in the presence of a CD4 retention phenomenon, is probably responsible for the observed decrease in infectivity. For other isolates, we observed a decrease in CD4 incorporation coupled with a decrease in viral envelope protein located within virions, leading to the speculation that Vpu, CD4 and Env might form a complex in the ER. Since Vpu's stability for this variant increases during its normal trafficking in the cell, it can be hypothesized that this complex translocates to cellular compartments other than the ER. This Vpu variant might undergo delayed/late degradation in other compartments, such as lysosomes. Additional experiments are needed to verify this hypothesis.

Keywords: HIV-1, Vpu, CD4 down-regulation, viral infectivity.

Table des matières

Résumé	iv
Summary	vi
Liste des figures	ix
Sigles et abréviations	xii
Remerciements	xiv
1. Introduction	1
2. Diversité génétique du VIH-1	3
3. Organisation génomique du VIH-1	4
4. Structure des virions	6
5. Cycle de réplication viral	7
5.1 Entrée du virus	7
5.1.1 Protéine de l'enveloppe (Env)	7
5.2 Décapsidation et transcription inverse	9
5.2.1 Transcriptase inverse (RT)	9
5.3 Import nucléaire et intégration de l'ADN viral	12
5.3.1 Intégrase (IN)	12
5.4 Transcription des gènes viraux	13
5.4.1 Tat (Transactivator of transcription)	13
5.5 Transport des ARN viraux dans le cytoplasme	14
5.5.1 Rev (Regulator of expression of viral proteins)	17
5.6 Synthèse des protéines accessoires	17
5.6.1 Nef (Negative factor)	17
5.6.2 Vif (Viral infectivity factor)	18
5.6.3 Vpr (Viral protein R)	19
5.6.4 Vpu (Viral protein U)	20
5.7 Assemblage et maturation des particules virales	20
5.7.1 Gag	20
5.7.2 Gag-Pol	21
5.7.2.1 Protéase virale (PR)	21
6. Assemblage, bourgeonnement et sortie des particules virales	22
6.1 Étapes de l'assemblage	22
6.1.1 Association de Gag à la membrane plasmique	22
6.1.2 Multimérisation de Gag	24
6.1.3 Bourgeonnement des particules virales	25
6.2 Interaction entre Gag et la protéine de l'enveloppe	26
6.3 Voie endosomale de sortie du VIH-1	26
7. Structure et fonctions de la protéine accessoire Vpu	29
7.1 Domaines structuraux de Vpu	29
7.1.1 Polymorphisme du gène <i>vpu</i>	30
7.2 Fonctions de Vpu	31
7.2.1 Augmentation de la relâche des particules virales	32
7.2.2 Dégradation du récepteur CD4	36
8. Importance de la régulation négative de la molécule CD4 durant l'infection par le VIH-1	41
Hypothèses et objectifs du projet de recherche	43
Matériel et méthodes	46
1. Plasmides et vecteurs d'expression	46
1.1 Clones moléculaires du VIH-1	46
1.2 Expresseurs de Vpu	46
1.3 Expresseurs de CD4	47
1.4 Autres vecteurs d'expression	47
2. Culture cellulaire et transfections	47
3. Isolation de l'ADN de PBMCs et Nested-PCR	48
4. Analyses par cytométrie en flux	49
4.1 Marquage de surface	49
4.2 Marquage total	50

5. Analyses protéiques	50
5.1 Anticorps	50
5.2 Marquages métaboliques et immunoprécipitations	51
5.2.1 Tests d'expression/ de dégradation de Vpu	51
5.2.2 Tests de dégradation du CD4	52
5.2.3 Tests de liaison à CD4 et à β -TrCP	52
6. Production virale	53
6.1 Coussin de sucrose	53
6.2 Essai de transcriptase inverse	53
6.3 Essai MAGI (essai d'infectivité)	54
6.4 Immunobuvardage (western blot)	54
Résultats	55
▪ La protéine Vpu provenant de certains isolats primaires est détectée à différents niveaux	55
▪ La protéine Vpu provenant de certains isolats primaires est incapable de dégrader efficacement CD4, malgré une liaison efficace à CD4 et à β -TrCP	61
▪ Capacité de rétention intracellulaire de la molécule CD4 par la protéine Vpu de différents isolats primaires	70
▪ La protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 a une plus grande stabilité que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTE Δ VEMG	74
▪ Mesure de l'infectivité des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> à l'aide de variants de Vpu capable d'induire une rétention intracellulaire du CD4	78
▪ Mesure de l'incorporation du CD4 à l'intérieur des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> à l'aide de variants de Vpu	83
Discussion	89
▪ Détection de la protéine Vpu	92
▪ Mécanisme moléculaire de rétention du CD4 par Vpu	93
▪ Implication du processus de rétention intracellulaire du CD4 par Vpu pour l'infectivité des particules virales	96
▪ Importance de la fonction de régulation négative du CD4	99
Conclusions	100
Références bibliographiques	101

Liste des figures

Figure 1 :	Phases de l'immunopathogenèse de l'infection au VIH-1	2
Figure 2 :	Vue d'ensemble de la répartition du VIH dans le monde en 2005	2
Figure 3 :	Organisation génomique du VIH-1	5
Figure 4 :	Structure des particules virales matures et immatures du VIH-1	6
Figure 5 :	Schématisation des étapes menant à l'entrée du VIH-1 dans la cellule	8
Figure 6 :	Mécanisme moléculaire de l'étape de transcription inverse du génome du VIH-1	11
Figure 7 :	Description des étapes précoces de l'infection par le VIH-1	15
Figure 8 :	Schématisation des étapes tardives de l'infection par le VIH-1	16
Figure 9 :	Schématisation des étapes tardives menant à l'assemblage des particules virales néo-synthétisées du VIH-1	23
Figure 10 :	Résumé des différents mécanismes de relâche possible du VIH-1	28
Figure 11 :	Structure hypothétique de la protéine accessoire Vpu du VIH-1	30
Figure 12 :	Schéma récapitulatif des fonctions biologiques de la protéine Vpu du VIH-1	34
Figure 13 :	Mécanismes de régulation négative de l'expression de surface de la molécule CD4 suite à l'infection par le VIH-1	37
Figure 14 :	Modèle de la dégradation de la molécule CD4 induite par la protéine Vpu du VIH-1	40
Figure 15 :	Différents modèles proposés pour expliquer la diminution de l'infectivité des particules virales lors de l'infection au VIH-1 induite par le CD4	42
Figure 16 :	Schématisation de l'approche utilisée pour l'amplification du gène Vpu à partir de l'ADNg extrait de PBMCs provenant de patients infectés par le VIH-1	49
Figure 17 :	Alignement des séquences consensus de la protéine Vpu du VIH-1 de différents sous-types	56
Figure 18A :	Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T : Détection de la protéine Vpu	59
Figure 18B :	Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T : Analyse quantitative	59
Figure 18C :	Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T : Analyse quantitative	59
Figure 18D :	Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T : Pourcentage d'expression	60
Figure 18E :	Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T : Pourcentage d'expression	60

Figure 19A : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont une plus faible capacité de dégradation de la molécule CD4 : Détection des protéines CD4 et Vpu	63
Figure 19B : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont une plus faible capacité de dégradation de la molécule CD4 : Cinétique de dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu	64
Figure 20A : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont la capacité de se lier de façon similaire à CD4 et à β -TrCP comparativement à un isolat de laboratoire et ce, après normalisation de leur quantité d'ADN transfectée en fonction d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de SVCMV-Vpu DTE Δ VEMG : Liaison à CD4	67
Figure 20B : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont la capacité de se lier de façon similaire à CD4 et à β -TrCP comparativement à un isolat de laboratoire et ce, après normalisation de leur quantité d'ADN transfectée en fonction d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de SVCMV-Vpu DTE Δ VEMG : Liaison à CD4	67
Figure 20C : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont la capacité de se lier de façon similaire à CD4 et à β -TrCP comparativement à un isolat de laboratoire et ce, après normalisation de leur quantité d'ADN transfectée en fonction d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de SVCMV-Vpu DTE Δ VEMG : Liaison à β -TrCP	68
Figure 20D : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont la capacité de se lier de façon similaire à CD4 et à β -TrCP comparativement à un isolat de laboratoire et ce, après normalisation de leur quantité d'ADN transfectée en fonction d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de SVCMV-Vpu DTE Δ VEMG : Liaison à β -TrCP	68
Figure 21A : Certains isolats primaires sont en mesure de retenir la molécule CD4 de manière intracellulaire	73
Figure 21B : Certains isolats primaires sont en mesure de retenir la molécule CD4 de manière intracellulaire	73
Figure 22A : La protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est plus stable que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTE Δ VEMG : Détection de la protéine Vpu	77

Figure 22B : La protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est plus stable que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG : Cinétique de dégradation de la protéine Vpu	77
Figure 23A : L'infectivité des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> à l'aide du gène <i>vpu</i> provenant d'isolats primaires est altérée en présence de CD4, à faible multiplicité d'infection	81
Figure 23B : L'infectivité des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> à l'aide du gène <i>vpu</i> provenant d'isolats primaires est altérée en présence de CD4, à faible multiplicité d'infection	81
Figure 24A : Analyse des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> du gène <i>vpu</i> provenant de divers isolats de laboratoire et primaires : Détection de CD4, gp120 et CD4 dans les lysats viraux	85
Figure 24B : Analyse des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> du gène <i>vpu</i> provenant de divers isolats de laboratoire et primaires : Détection de CD4 et p24 dans les lysats cellulaires	85
Figure 24C : Analyse des particules virales produites par complémentation en <i>trans</i> du gène <i>vpu</i> provenant de divers isolats de laboratoire et primaires : Analyse quantitative	84

Sigles et abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN, ADNc, ADNg	Acide désoxyribonucléique, ADN complémentaire, ADN génomique
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i> ; facteur de restriction cellulaire ciblé par Vif
ARN, ARNm, ARNt	Acide ribonucléique, ARN messenger, ARN de transfert
ARN pol II	ARN polymérase II
BFA	Brefeldine A
β-gal	Beta-galactosidase
β-TrCP	Composante de spécificité du complexe E3 ubiquitine ligase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
°C	Degré Celsius
CA	Capside
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> ; classe de différenciation 4, protéine membranaire des cellules T auxiliaires
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> ; classe de différenciation 8, protéine membranaire des cellules T cytotoxiques
CRF	<i>Circulating recombinant forms</i> ; formes circulantes recombinantes
CMH, CMH-I, CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité, CMH de type I, CMH de type II
CO₂	Dioxyde de carbone
cpm	Coup par minute
cpz	Chimpanzé
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Sulfoxyde de diméthyle
dNTP	Désoxynucléoside triphosphate
DOC	Sel d'acide désoxycholique
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E1	<i>Ubiquitin-activating enzyme</i> ; enzyme d'activation de l'ubiquitine
E2	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i> ; enzyme de conjugaison de l'ubiquitine
E3	<i>Protein-ubiquitin ligases</i> ; enzyme de ligation de l'ubiquitination
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EE	<i>Early endosomes</i> ; endosomes précoces
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> ; protéine verte fluorescente rehaussée
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
Env	Enveloppe
FACS	<i>Fluorescent-activated cell sorter</i> TM (Becton Dickinson)
Gag	<i>Group antigen</i>
GPI	Glycophosphatidylinositol
gp41	Glycoprotéine 41 de l'enveloppe (portion transmembranaire)
gp120	Glycoprotéine 120 de l'enveloppe (portion à la surface)
gp160	Glycoprotéine 160 de l'enveloppe (précurseur)
GSH	Gluthatione réduit
IL	Isolat(s) de laboratoire
IP	Isolat(s) primaire(s)
³H	Isotope 3 de l'hydrogène
HAT	Histone acetyl transférase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRS	<i>Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

LE	<i>Late endosome</i> ; endosomes tardifs
LTNP	<i>Long-term non-progressor</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
Lys	Lysine
MA	Matrice
MAGI	<i>Multinuclear activation of galactosidase indicator cells</i>
min	Minute
mM	Millimolaire
M.O.I.	<i>Multiplicity of infection</i> ; multiplicité d'infection
μCi	Microcurie
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
MVBs	<i>Multivesicular bodies</i> ; corps multivésiculaires
NC	Nucléocapside
Nef	<i>Negative regulatory factor</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> ; facteur nucléaire kappa B
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> ; signal de localisation nucléaire
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> : resonance magnétique nucléaire
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> ; cellules de sang périphériques mononucléaires
PBS	<i>Primer binding site</i> ; site d'attachement de l'amorce
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; solution saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; réaction de polymérisation en chaîne
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Constante d'acidité
PI(4,5)P₂	Phosphatidylinositol (4,5) bi-phosphate
PIC	<i>Pre-integration complex</i> ; complexe de pré-intégration
Pol	Polymérase
Poly(rA)-Oligo(dT)	<i>Polyadenylic acid pentadecathymidylic acid</i>
PR	Protéase
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	<i>Regulator of expression of virion protein</i>
rpm	Révolution par minute
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i> ; transcriptase inverse
³⁵S	Isotope 35 du soufre
sec	Seconde
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHIV	Virus chimérique de l'immunodéficience humaine et simienne
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SVF	Sérum foetal de veau
SV40	<i>Simian virus 40</i> ; virus simien 40
TAR	<i>Trans-activating responsive element</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> ; récepteur des cellules T
Tat	<i>Transactivator of transcription</i> ; transactivateur de la transcription
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; tampon salin
TCA	Acide trichloro-acétique
TM	Transmembranaire
Vif	<i>Viral infectivity factor</i> ; Facteur de l'infectivité viral
VIH-1, VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1, VIH de type 2
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Éric A. Cohen. Je voudrais remercier particulièrement les membres de l'Unité de Rétrovirologie Humaine : Jean-Philippe Belzile, pour la Russie accessible et pour ce partage de Tsvétaéva... nous nous seront compris ; Julie Binette, pour ces précieux conseils scientifiques et sociaux, mais surtout pour son amitié intégrale qui a ensoleillée même les journées les plus sombres ; Rachel Bourgeois, pour m'avoir transmis un sens de l'organisation hors du commun, mais aussi pour les matins où les tips tombent dans le phénol-chloroforme et les paons se promènent dans les parcs... ; Alexandre Caillaud, cher Français inoubliable pour son incompréhension devant certaines expressions québécoises et aussi pour certaines discussions animées sur certains sujets (je suis sûre que tu comprendras) ; Gang Chen, pour son sens de la répartie ; Philippe Courtemanche-Asselin, pour avoir partagé son savoir et pour nos discussions enrichissantes ; Mathieu Dubé, pour son incessant babillage qui est une douce musique à mes oreilles (et qui me manquera d'ailleurs beaucoup durant mes études à venir) et bien sûr pour cette amitié franche sans conditions, sans oublier les petites bières après les dures journées ; Andrés Finzi, pour ses judicieux conseils, mais surtout pour sa confiance ; Solange Louiseize, pour ces pauses-café bienfaitrices et ces sorties sur la Main comme entre sœurs ; Johanne Mercier et Nicole Rougeau, pour tout le support, tant technique que moral et pour les encouragements continus ; Geneviève St-Onge, pour toute ton infinie compréhension et pour m'avoir entraînée dans cette merveilleuse aventure qu'est le chœur Les Voix de la Montagne ; Alexandre Orthwein, pour son adorable sourire, son gâteau exquis et les taquineries ; Mélanie Welman, pour avoir été si longtemps (et encore aujourd'hui) la lumière de mes journées et surtout pour cette épaule toujours présente et ce cœur si grand ; Yong Xiao, pour ces encouragements et ces discussions qui m'ont souvent permis d'aller de l'avant... une pensée spéciale pour ce futur docteur qui mérite le meilleur de la recherche. Vous êtes un peu comme ma deuxième famille.

À toutes celles du laboratoire du Dr Archambault, en particulier Hélène Sénéchal et Amélie Fradet-Turcotte, qui m'ont supporté et apporté joie, exil et réconfort tout au long de ce difficile parcours. Un merci particulier aussi à Éric Massicotte et Martine Dupuis de l'équipe de cytométrie en flux de l'IRCM, tant pour le support technique que pour les encouragements fortement appréciés.

À ma merveilleuse amie Marie, qui est là depuis des temps immémoriaux, peu importe l'état, peu importe l'endroit. Pour ces discussions philosophiques et ces moments qui me rappelaient que j'étais... que je suis.

À Mama Karina, pour un soir d'hiver où parler décoration aura fait toute la différence. À Matante Line et Mononcle Antoine, pour m'avoir changé les idées parfois.

À Marc Robillard, fidèle compagnon des mercredis « chorale » avec qui les discussions sont toujours vraies et passionnantes.

À mes deux chats aussi, Smog et Moustafa qui, bien malgré eux, m'ont donné des moments de détente et d'affection quasi inconditionnels (tant que nourriture il y a ...)

À ma fantastique belle-famille, qui m'a toujours accueillie avec le sourire. Plus particulièrement à France et Guy qui m'ont toujours écouté, appuyé et conseillé... C'est un peu grâce à vous si j'y suis parvenue.

À mon époux, Jonathan qui a toujours cru en moi et qui, malgré les difficultés de la recherche, a respecté mes choix, si difficiles fût-ils...

Bien sûr, à mes parents extraordinaires, Lise et Richard, qui, malgré la distance, ont toujours été là en pensées et ne m'ont jamais abandonnée... Merci d'avoir respecté mes choix et de m'avoir donné les outils pour y parvenir.

« Après la pluie, le beau temps. »

« On fait la science avec des faits, comme
on fait une maison avec des pierres : mais une
accumulation de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison »

-Henri Poincaré

1. Introduction

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été découvert tôt au début des années 80 (128, 215). Le rôle du VIH dans le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été établi suite à de multiples études épidémiologiques ainsi qu'à la suite de l'isolement et la mise en culture du virus en soi (2-4, 22, 115, 116, 254). En effet, à quelques jours près en 1983, les groupes des Dr Montaigner et Barré-Sinoussi isolaient les premiers virus responsables de cette affectation, qui semblaient être apparentés morphologiquement et génétiquement aux rétrovirus et plus particulièrement à la sous-famille des lentivirus. La découverte d'autres lentivirus causant des pathologies similaires chez les humains et les grands primates et ayant des similitudes au niveau génétique et morphologique a mené à l'établissement de relations phylogénétiques entre le VIH-1, le VIH de type 2 (VIH-2) et le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Ainsi, le VIH-1 pourrait être dérivé du VIS_{czp} (chimpanzé) alors que le VIH-2 serait dérivé du VIS_{sm} (sooty mangabey) (156, 175). La pathogenèse de l'infection par le VIH-1 a été caractérisée comme une dégénérescence du système immunitaire ainsi que du système nerveux central, en plus de s'attaquer largement aux cellules épithéliales du système digestif (62, 71, 183). Ce virus est aussi reconnu pour sa capacité à infecter les cellules dendritiques ainsi que les cellules en arrêt de division tel que les macrophages et les monocytes (47, 120, 191). Les principaux signes de la pathogenèse sont tout d'abord une diminution sévère et marquée des cellules lymphocytaires T CD4 positives, une augmentation importante de la susceptibilité aux infections opportunistes et une augmentation marquée de l'incidence de certains types de cancer, tel le sarcome de Kaposi (128, 230, 271). L'infection se caractérise par trois phases distinctes et débute avec une phase dite aiguë, qui implique une importante virémie et une diminution rapide du nombre de cellules T CD4 positives (voir figure 1) (77, 179, 242). La seconde phase, dite phase chronique, survient lorsque la virémie est stabilisée en partie par la réponse immunitaire et s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules T CD4 positives (179). Finalement, une diminution lente du nombre de cellules T CD4 positives accompagnée d'une augmentation progressive de la virémie ainsi que l'apparition de symptômes et de maladies opportunistes, caractérisent la phase SIDA (1). Selon le rapport 2006 de l'UNAIDS/WHO (United Nations program on HIV/AIDS, World Health Organization) portant sur l'épidémie globale du SIDA, environ 39 millions de personnes sont présentement infectées par le VIH-1 dans le monde. Ils estiment que pour l'année 2005 seulement, 4,1 millions de personnes ont été nouvellement infectées alors que 2,8 millions de personnes ont succombé des suites de la progression de la maladie (313). Les régions les plus touchées sont les pays de l'Afrique Sub-Saharienne (voir figure 2), qui comptent 25 millions de personnes infectées, soit environ les 2/3 de la population mondiale vivant actuellement avec le SIDA.

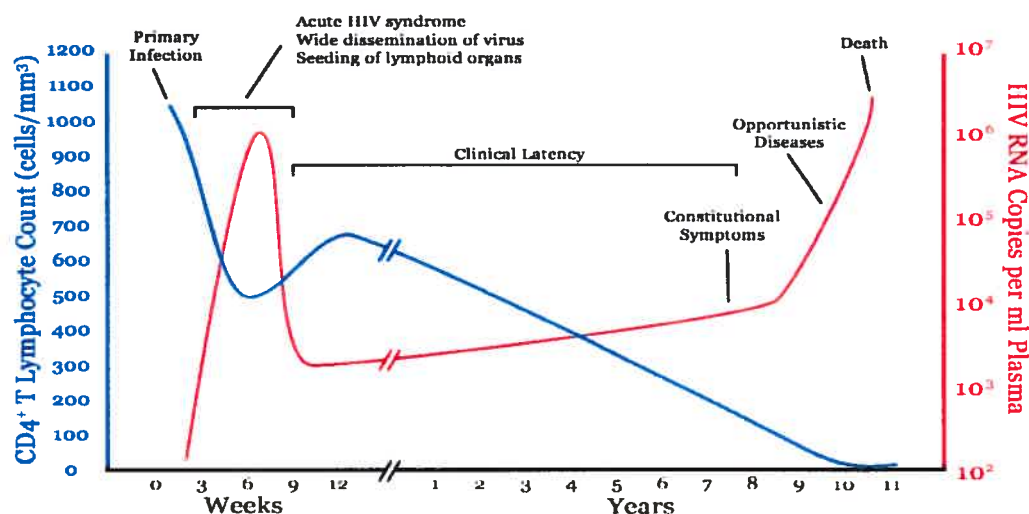


Figure 1 : Phases de l'immunopathogénèse de l'infection au VIH-1. L'infection par le VIH-1 est caractérisée par trois phases distinctes débutant par la primo-infection, suivie de la phase chronique, puis se terminant par la phase SIDA. Lors de la première phase, il y a une augmentation marquée de la virémie ainsi qu'une diminution importante du nombre de lymphocytes T CD4⁺. Au début de la phase chronique ou latente, il y a une diminution de la virémie ainsi qu'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺. Plus on progresse dans la phase chronique, plus la virémie augmente et plus le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue. Lors de la phase SIDA, il se produit une augmentation importante de la charge virale et une diminution marquée de lymphocytes T CD4⁺. C'est à ce stade que les infections opportunistes apparaissent chez l'hôte. (Figure adaptée de Pantaleo, G., and A. S. Fauci. 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 13:487-512).

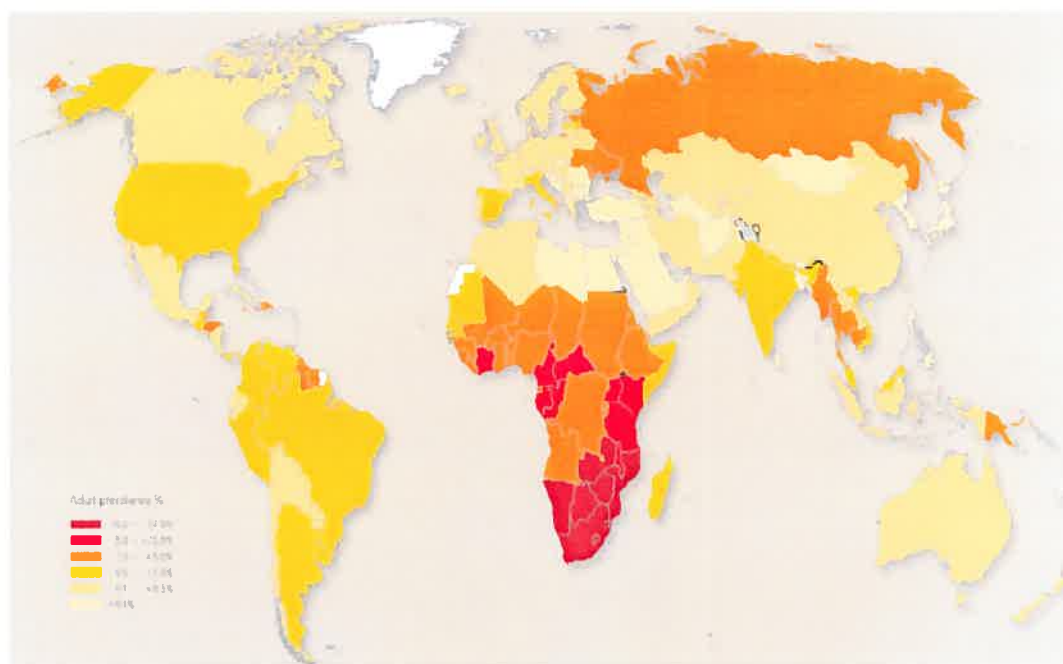


Figure 2 : Prévalence du VIH-1 dans le monde pour l'année 2005. Le rapport annuel des Nations Unies et de l'Organisation Mondiale de la Santé sur le programme SIDA/VIH estime qu'il y a entre 33 et 46 millions de personnes vivant actuellement avec le VIH, dont la majeure partie se retrouve dans les pays de l'Afrique Sub-Saharienne. (Figure reproduite de Overview of the global AIDS epidemic. 2006. UNAIDS/WHO)

2. Diversité génétique du VIH-1

On peut attribuer au VIH-1 la majeure partie de la pandémie responsable du SIDA, bien que le VIH-2 y contribue aussi sur le continent africain. Basé sur les différences phylogénétiques retrouvées au niveau des séquences de différents isolats du VIH-1, les souches ont été classifiées en groupes, sous-types et formes circulantes recombinantes (« CRF : circulating recombinant forms »). Ainsi, le VIH-1 a été divisé en trois groupes différents, considérés comme hautement divergent, soit le groupe M (majeur), O (« outlier ») et N (non-M/O) (166). À l'intérieur du groupe M, il est possible de retrouver neuf sous-types, soit les sous-types A, B, C, D, E, F, G, H, J et K, et 15 formes circulantes recombinantes (180, 264). Les deux sous-types qui sont responsables de la majorité des nouveaux cas d'infection au travers le monde sont les sous-types C et A (313). Il est à noter que les sous-types diffèrent entre eux par une différence de 20% au niveau de la séquence nucléotidique du gène de l'enveloppe, 16% au niveau de la séquence nucléotidique du gène *gag* (263) et finalement, 10-12% de leurs séquences de nucléotides et une différence de 5 à 6% des acides aminés au niveau de la protéase (PR) et de la rétrotranscriptase inverse (RT) (127). En plus d'une diversité entre les sous-types, certaines études ont aussi démontré qu'il existe des différences génétiques et antigéniques au niveau du sous-type B. En effet, un variant ayant été nommé B' montre une divergence au niveau de certains motifs généralement bien conservé de la protéine de l'enveloppe (29, 222, 256). D'autre part, il a été montré que lors des premiers stades de l'infection au VIH-1, il est possible de retrouver dans un seul échantillon de multiples quasi-espèces, ce qui peut être attribuable à la pression exercée par le système immunitaire sur les virions ou encore à la réponse du virus face à une thérapie anti-rétrovirale (11, 15, 16). Ainsi, il est possible de croire que les protéines du VIH-1 subissent des mutations mineures ou majeures, tant au niveau de leur séquence nucléotidique que de leur séquence d'acides aminés, pouvant altérer le fonctionnement normal desdites protéines.

Le gène *pol* est naturellement une région polymorphique du VIH-1, ce qui est attribuable à un taux élevé de réplication ainsi qu'à la faible fiabilité de la RT, l'enzyme nécessaire à la transcription de l'ARN viral en ADN. Étant donné que la RT ne possède pas de mécanisme de correction des erreurs lors de la réplication du virus, il a été estimé qu'environ une mutation se produit à chaque cycle de réplication, causant ainsi un taux de mutation élevé au niveau du génome du VIH-1 (232). De plus, la co-infection d'un individu avec divers sous-types du VIH-1 peut mener à la formation de souches recombinantes ayant des propriétés divergentes de celles des souches d'origines (291). Évidemment, les mutations qui surviennent dans des protéines étant des cibles de drogues anti-rétrovirales (PR, RT) sont susceptibles de conférer une résistance à ces substances et ainsi, causent l'émergence de souches résistantes aux traitements disponibles sur le marché. Les mutations causant une résistance ont été classées selon qu'elles

sont majeures ou mineures, en se basant sur la séquence des isolats de sous-types B (166). Ainsi, il a été décrit que les mutations mineures ont peu d'effets sur la susceptibilité de l'isolat aux anti-rétroviraux et sont généralement des mutations compensatoires ayant pour but d'augmenter la réplactivité du virus (166). Les mutations dites majeures sont celles qui vont entraîner une diminution importante de la susceptibilité de l'isolat aux anti-rétroviraux et se développent souvent lors de l'oubli de certaines doses de médicaments. Il est à noter que des mutations peuvent être retrouvées à tous les niveaux du génome du VIH-1 et non seulement au niveau des protéines qui sont la cible de drogues anti-rétrovirales. Le polymorphisme de la protéine Vpu sera traité dans une section ultérieure.

3. Organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 appartient à la famille des Retroviridae et plus particulièrement à la sous-famille des Lentiviridae. Les Retroviridae sont des virus enveloppés possédant un génome composé d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire linéaire de polarité positive. Une caractéristique importante de cette famille de virus est la nécessité, lors du cycle de répllication, de rétrotranscrire le génome ARN en génome composé d'acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire afin que celui-ci puisse être intégré au génome de la cellule hôte infectée. Étant donné que le VIH-1 code pour des gènes accessoires et régulateurs en plus des gènes structuraux *gag*, *pol* et *env*, il est considéré comme un rétrovirus complexe. (68) La taille des particules virales est d'environ 145 nm et le génome ARN complet fait 9,8 kilobases (kb) (226). Une fois rétrotranscrit en ADN et intégré à l'ADN cellulaire, le génome rétroviral prend l'appellation de génome proviral. Chacune des extrémités du génome rétroviral porte une séquence identique qui est nommée « long terminal repeat » (LTR) et est composée des régions U3, R et U5. Deux fonctions incombent à cette partie du génome viral, la première étant l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte nouvellement infectée alors que le second rôle en est un de régulation de la transcription des ARN viraux (265). Effectivement, dans la région U3 du LTR retrouvé en 5' du génome rétroviral, on retrouve des séquences régulatrices ainsi que la séquence du promoteur qui permettra l'initiation et l'élongation des ARN viraux. La boîte TATA est retrouvée aux positions -29 à -24 en amont du codon d'initiation et permettra le recrutement successif des facteurs de transcription TFIID puis TFIIB, ce qui mènera ultimement au recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire. La séquence de polyadénylation (AATAAA) est plutôt retrouvée au niveau de la région R et est active seulement dans le LTR en 3' du génome (175). La région R est en fait une séquence répétée qui est nécessaire pour le transfert des brins d'ADN synthétisés, à partir de l'ARN viral, entre les brins matrices. Comme mentionné précédemment, le VIH-1 code pour des gènes structuraux, comme le font les rétrovirus simples. Le gène *gag* (« Group-specific antigen ») code pour le précurseur de la capsid virale et est

clivé protéolytiquement pour donner les protéines de la matrice (MA), de la capside (CA) et de la nucléocapside (NC). Le gène *pol* est nécessaire à la production des enzymes virales et code pour la transcriptase inverse (RT), pour l'intégrase (IN) ainsi que pour la protéase (PR). Le dernier des gènes communs à tous les rétrovirus est le gène *env* nécessaire à la production des protéines constituant l'enveloppe virale, soit la glycoprotéine de surface (SU ou gp120) ainsi que la glycoprotéine transmembranaire (TM ou gp41). Les gènes accessoires retrouvés chez les rétrovirus complexes sont, quant à eux, tous exprimés à partir d'ARN uni- ou multi-épissés et sont retrouvés dans la région chevauchant le gène *pol*, tel que *vif* ou en amont du gène *env*, tel que *vpr* (voir figure 3). On retrouve également les gènes régulateurs *tat* et *rev* qui ont un exon en amont de *env* et un à l'intérieur de ce dernier, mais dans des cadres de lecture différents. Le gène accessoire *vpu* chevauche aussi le gène *env* alors que le gène *nef* chevauche plutôt la région U3 du LTR retrouvé en 3' (voir figure 3) (68, 134). Ces protéines sont dites accessoires car leur présence n'est pas nécessaire à la réplication du virus *in vitro*, mais sont impliquées au niveau de l'optimisation de l'infection et de la pathogenèse *in vivo*.

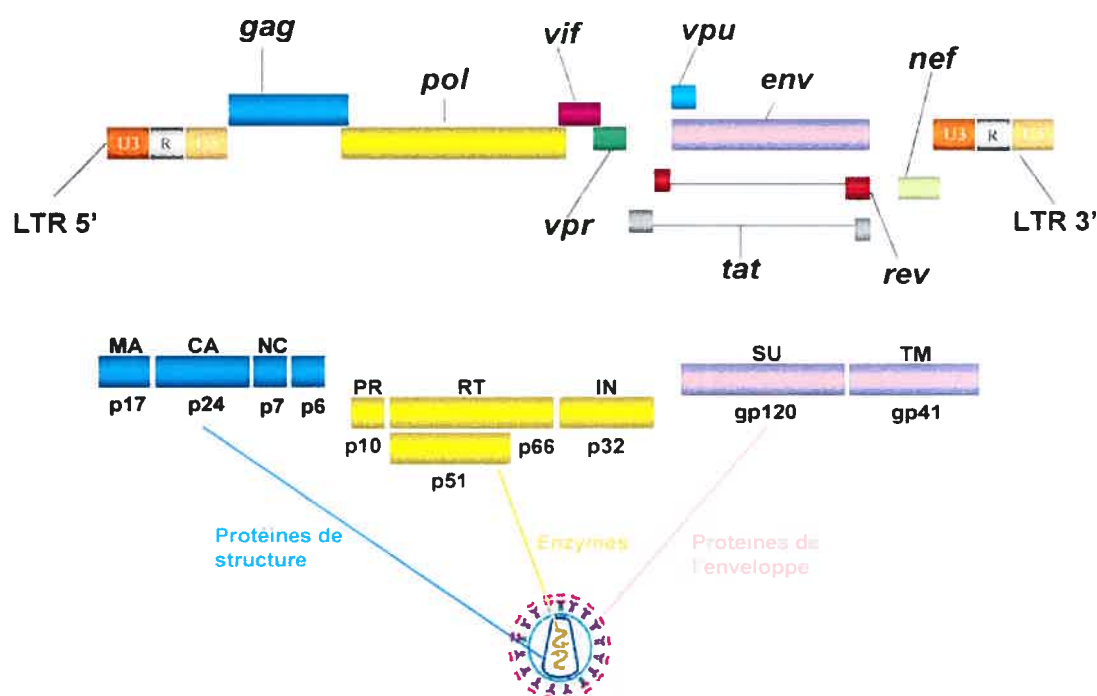


Figure 3 : Organisation génomique du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1.

Le gène *gag* code pour les protéines de structure tel que la protéine de la matrice (MA ; p17), la protéine de la capside (CA ; p24), la protéine de la nucléocapside (NC ; p7) ainsi que la protéine p6. Le gène *pol* code pour les protéines dites enzymatiques tel que la protéase virale (PR ; p10), la transcriptase inverse (RT ; p51, p66) ainsi que la protéine de l'intégrase (IN ; p32). Le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe dont la sous-unité de surface (gp120) et la sous-unité transmembranaire (gp41). Le VIH-1 possède aussi des gènes dits accessoires tel que les protéines *Vif*, *Vpr*, *Tat*, *Rev*, *Vpu* et *Nef*. À chacune des extrémités du génome viral est retrouvée une structure répétée appelée LTR (Long Terminal Repeat). (Figure adaptée de Greene, W.C. & Peterlin, B.M., 2002. Charting Hiv's remarkable voyage to the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.* 8(7) ; 673-680.)

4. Structure des virions

La sortie des particules virales formées par le VIH-1 s'effectuant par bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire, il est normal de retrouver autour de la particule virale une enveloppe lipidique (102). On retrouve inséré dans cette membrane des structures nommées spicules qui, au nombre de 70 à 80, sont en fait formées des sous-unités transmembranaire (gp41) et de surface (gp120) de la glycoprotéine de l'enveloppe (voir figure 4) (121). À l'intérieur de l'enveloppe virale, on retrouve la protéine matrice (MA) qui tapisse l'intérieur de celle-ci. Au centre des virions matures, on retrouve une structure de type conique qui est appelée « core », composée de la protéine de la capside (CA ou p24), à l'intérieur de laquelle on retrouve deux copies du génome ARN viral. Ces deux copies du génome sont en contact avec les protéines de la nucléocapside (NC ou p7) qui recouvrent la partie intérieure de la capside. Celle-ci contient aussi de multiples copies des enzymes virales RT, IN ainsi qu'un ARN^t_{lys} qui aura pour but d'initier la transcription inverse. La PR se retrouvera plutôt à l'extérieur de ladite capside (107). Il a été démontré que certaines des protéines accessoires, telles que Vif, Nef et Vpr, sont incorporées à différents niveaux à l'intérieur de la capside virale (44, 52, 69). Il est aussi possible que certaines protéines cellulaires se retrouvent à l'intérieur des particules virales comme par exemple les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH-I, CMH-II), la cyclophiline A, la molécule de CD4 (récepteur viral), l'ubiquitine, l'actine, β 2-microglobuline (19, 106, 181).

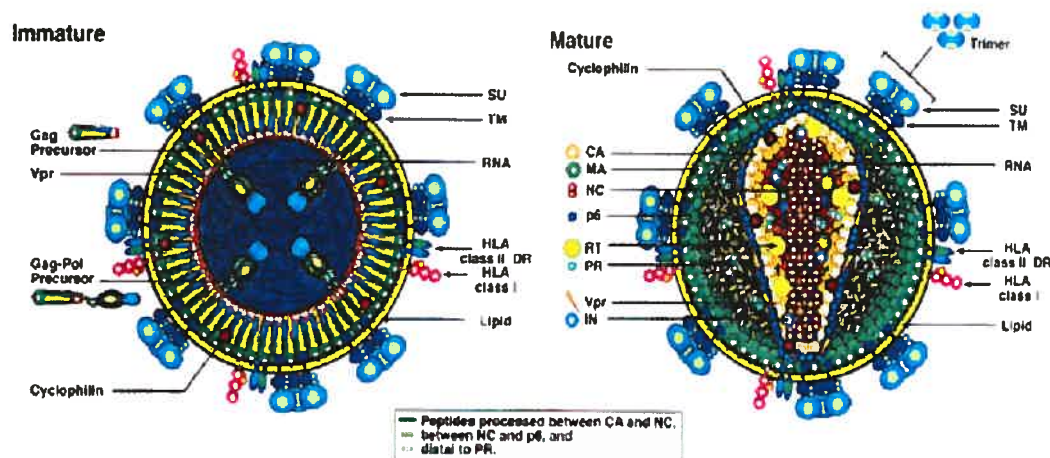


Figure 4 : Structure des particules virales matures et immatures du VIH-1. Schématisation de l'organisation des particules virales matures (droite) et immatures (gauche) montrant les enzymes, protéines de l'enveloppe, protéines structurales ainsi que certaines protéines cellulaires incorporées dans les virions. (Figure provenant de *Rétrovirus*, Coffin, John M. ; Hugues, Stephen H. ; Varmus, Harold E. Plainview (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press ; c1997)

5. Cycle de réplication viral

5.1 Entrée du virus

La première étape de l'infection par le VIH-1 est l'attachement des particules virales aux récepteurs à la surface cellulaire et est initiée suite à l'interaction entre la glycoprotéine de surface (gp120) virale et la molécule CD4 cellulaire. En effet, le CD4 a été le premier récepteur rétroviral à avoir été identifié, mais il a vite été démontré que celui-ci n'était pas suffisant pour obtenir une infection efficace des cellules par le VIH-1 (32, 78, 173). Effectivement, il avait été observé que certains isolats infectaient seulement les cultures de macrophages primaires alors que d'autres se répliquaient plutôt dans les lignées de cellules T, comme les cellules T CD4⁺. Les premiers avaient donc été désignés comme étant macrophage-tropique ou M-tropique alors que les seconds ont été appelés T-tropique. Des efforts soutenus ont mis en évidence que ce tropisme viral était dû à l'utilisation de seconds récepteurs, ou co-récepteurs, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (25, 90). Les virus dits M-tropiques vont utiliser comme co-récepteurs un récepteur de chimiokine- β , le CCR5, alors que les virus T-tropiques vont utiliser un récepteur de chimiokine- α , le CXCR4. Ces isolats seront respectivement nommés virus R5 et virus X4, alors que les isolats qui sont en mesure d'utiliser les deux types de co-récepteurs seront nommés X4R5. Si l'on s'attarde maintenant au récepteur principal, le CD4, il s'agit d'une molécule de 55 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule, composée de quatre domaines extracellulaires (D1 à D4), est normalement impliquée dans la stabilisation du complexe formé par le récepteur des lymphocytes T (TCR) avec la molécule du CMH-II, lors de réponses immunitaires. La région de CD4 responsable de la haute affinité de liaison pour la gp120 est retrouvée dans la portion N-terminale du domaine extracellulaire (108).

5.1.1 Protéine de l'enveloppe (Env)

La glycoprotéine de l'enveloppe est synthétisée sous forme de précurseur, soit la gp160, au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et sa maturation comporte des étapes de glycosylation. Le clivage du précurseur gp160 est effectué par une protéase cellulaire, la fusine, lors de son transport vers la surface cellulaire. La maturation de la protéine de l'enveloppe résulte en deux sous-unités, l'une transmembranaire (gp41), l'autre de surface (gp120), qui resteront liées de façon non covalente au niveau des régions N-terminal (nucléotides 36 à 45) et C-terminal (nucléotides 491 à 501) de la gp120 (143). La molécule gp120 est constituée de cinq domaines conservés (C1 à C5) ainsi que de 5 domaines variables (V1 à V5). La région de haute affinité pour le CD4 est retrouvée au niveau des domaines conservés C3 et C4 et cette liaison entraîne un changement de conformation de la gp120 (voir figure 5) permettant de dévoiler une région d'affinité pour le co-récepteur qui sera soit le CCR5 ou le CXCR4, dépendamment des résidus retrouvés dans la région variable V3 (234). Ce nouveau complexe formé de la gp120, du

CD4 et du co-récepteur permet la formation du peptide de fusion à la suite d'un second changement de conformation impliquant la gp41. Ceci mène alors à l'insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire grâce à la formation d'une structure dite en épingle à cheveux et ultimement, à la fusion de l'enveloppe virale et à l'entrée de la particule virale dans la cellule cible (25, 90, 175).

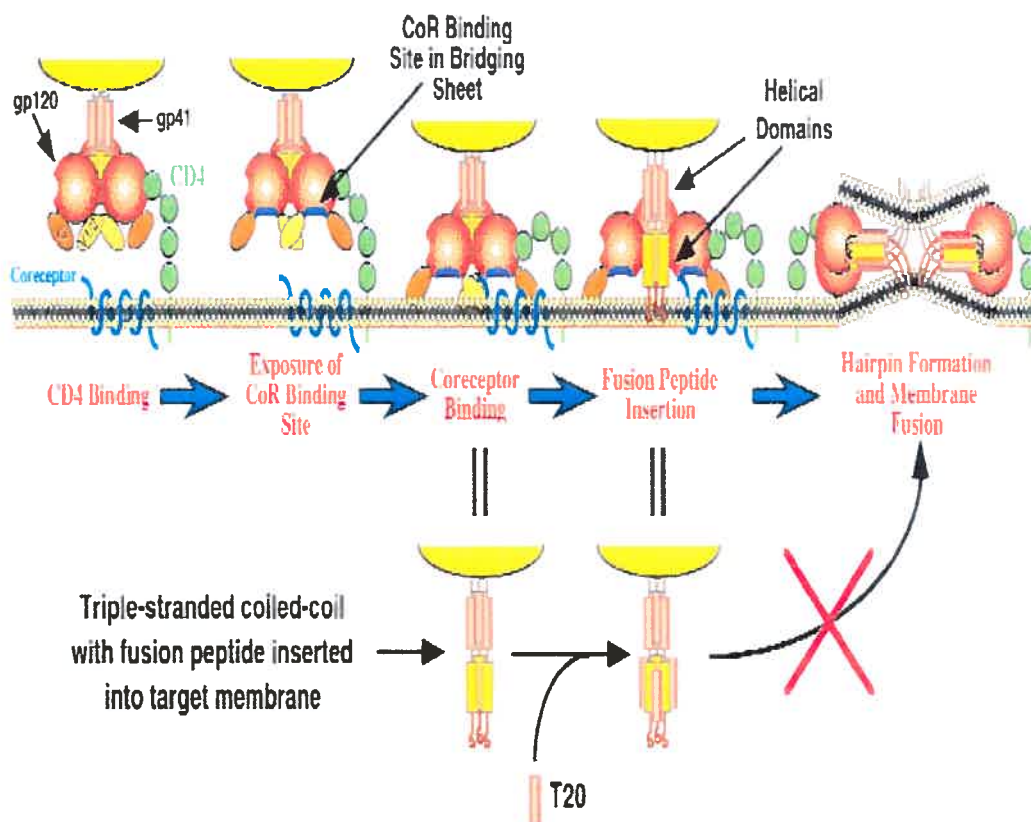


Figure 5 : Schématisation des étapes menant à l'entrée du VIH-1 dans la cellule. La liaison de la molécule CD4 à la protéine de surface de l'enveloppe, la gp 120, permet le dévoilement d'un motif de liaison au co-récepteur au niveau de la gp120. La liaison du co-récepteur permet la formation du peptide de fusion impliquant la sous-unité transmembranaire de la protéine de l'enveloppe, soit la gp41. Ce processus mène à l'insertion du peptide de fusion au niveau de la membrane de la cellule cible et implique la formation d'une structure en épingle à cheveux. Dans les plus récentes thérapies anti-rétrovirales, on retrouve des inhibiteurs de la fusion, tel le T20, qui ont pour but d'éviter la formation de la structure en épingle à cheveux et prévenant ainsi la fusion des virions avec la membrane cellulaire. (Figure reproduite de Doms, R.W. et Trono, D. 2000. The plasma membrane as a combat zone in the HIV's battlefield. *Genes and development* 14: 2677-2688.)

5.2 Décapsidation et transcription inverse

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, la capsid virale est relâchée au niveau du cytoplasme cellulaire. La suite des événements comprend l'étape de décapsidation qui est resté jusqu'à ce jour plutôt obscur. Cette étape comprend la perte des protéines de la capsid afin de laisser la possibilité à la transcriptase inverse de rétrotranscrire le génome viral à ARN en ADN (147). Il est aussi connu que durant cette étape, les protéines de la matrice, la nucléocapsid, la transcriptase inverse, l'intégrase, une amorce de ARN^{lys} et la protéine accessoire Vpr resteront associées à l'ARN viral. On retrouve alors des particules sous-virales de deux types, soit les complexes de rétrotranscription (RTC) et les complexes de pré-intégration (PIC) (48, 134, 220). Cependant, une étude récente a montrée qu'il serait possible que les protéines MA et CA ne soient pas retrouvées au niveau des PIC et seraient plutôt perdues lors de la décapsidation (98). Il a été démontré que les RTCs s'associent rapidement au cytosquelette cellulaire, probablement suite à l'interaction entre la protéine de la matrice et l'actine (45). Certaines protéines cellulaires et virales semblent aussi être impliquée dans la décapsidation et la rétrotranscription des particules virales. En effet, Nef, Vif et la cyclophiline A semblent avoir un rôle à jouer dans les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1. Nef agirait à la fois au niveau de la décapsidation et de la transcription inverse (8, 9), alors que Vif serait impliqué au niveau de la stabilisation des RTCs (235, 318). En ce qui concerne la cyclophiline A (CypA), elle serait nécessaire pour la protection de la capsid virale contre le facteur de restriction humain Ref1 et serait importante pour parvenir à une décapsidation optimale du VIH-1 (41, 312). Les étapes précoces du cycle de réplication viral sont synthétisées à la figure 7.

5.2.1 Transcriptase inverse (RT)

Le processus de transcription inverse catalysé par l'enzyme de la transcriptase inverse est défini comme étant l'étape où le génome viral ARN simple brin est converti en ADN double brin (68). La RT est retrouvée sous forme d'hétérodimère dont l'une des sous-unités est de 66 kDa (p66) alors que la seconde est de 51 kDa (p51). L'étape de transcription inverse utilise des éléments du génome viral agissant *in cis* et nécessite différentes activités enzymatiques de la RT. En effet, la RT possède une activité ADN polymérase ARN dépendante, ce qui permet de produire un brin d'ADN à partir de l'ARN matrice ; une activité RNaseH qui a pour but de dégrader les brins d'ARN des hybrides ARN-ADN ; finalement, une activité ADN polymérase ADN dépendante. Une des particularités de la transcriptase inverse est son absence de mécanisme de correction des erreurs, ce qui entraîne un haut taux de mutations et est impliqué dans le polymorphisme et la diversité du VIH-1 (206). Le processus de transcription peut être résumé en quelques étapes et est schématisé à la figure 6. En premier lieu, le processus de rétrotranscription est initié à l'aide de l'ARN^{lys} qui se lie au site de liaison de l'amorce (PBS, « primer binding site »), ce qui permet la synthèse d'un hybride ARN/ADN en 5' de l'ARN viral. Par la suite, l'activité RNaseH de la RT dégrade le brin ARN de l'hybride générant ainsi

un fragment d'ADN négatif (ADN (-)) qui sera appelé par la suite « strong stop DNA ». Survient ensuite l'étape nommée premier transfert de brin (« first strand transfer ») qui consiste au saut du brin d'ADN (-) à une région d'homologie R en 3' du génome, brin qui sera alors allongé et complété. Une petite portion de l'ARN est conservée, connue sous le nom de « polypurine tract » (PPT), et servira d'amorce à la synthèse du brin d'ADN positif (ADN (+)) en 5'. Il y a alors dégradation de la séquence PPT ainsi que de l'ARNt^{lys} au niveau du PBS par l'activité RNaseH, ce qui permet le second transfert de brin. Le brin d'ADN (+) fait donc un saut pour se lier à la séquence PBS retrouvée en 3' du brin d'ADN (-) et les brins (-) et (+) d'ADN sont allongés et complétés pour former un hybride ADN-ADN comprenant les séquences LTR dupliquées à chacune des extrémités et ayant exactement la même orientation (108). Il est à noter que les premiers médicaments anti-rétroviral ont été des inhibiteurs de la RT. Cependant, dû au taux de mutations élevé causé par cette enzyme, une résistance rapide à ces molécules survient.

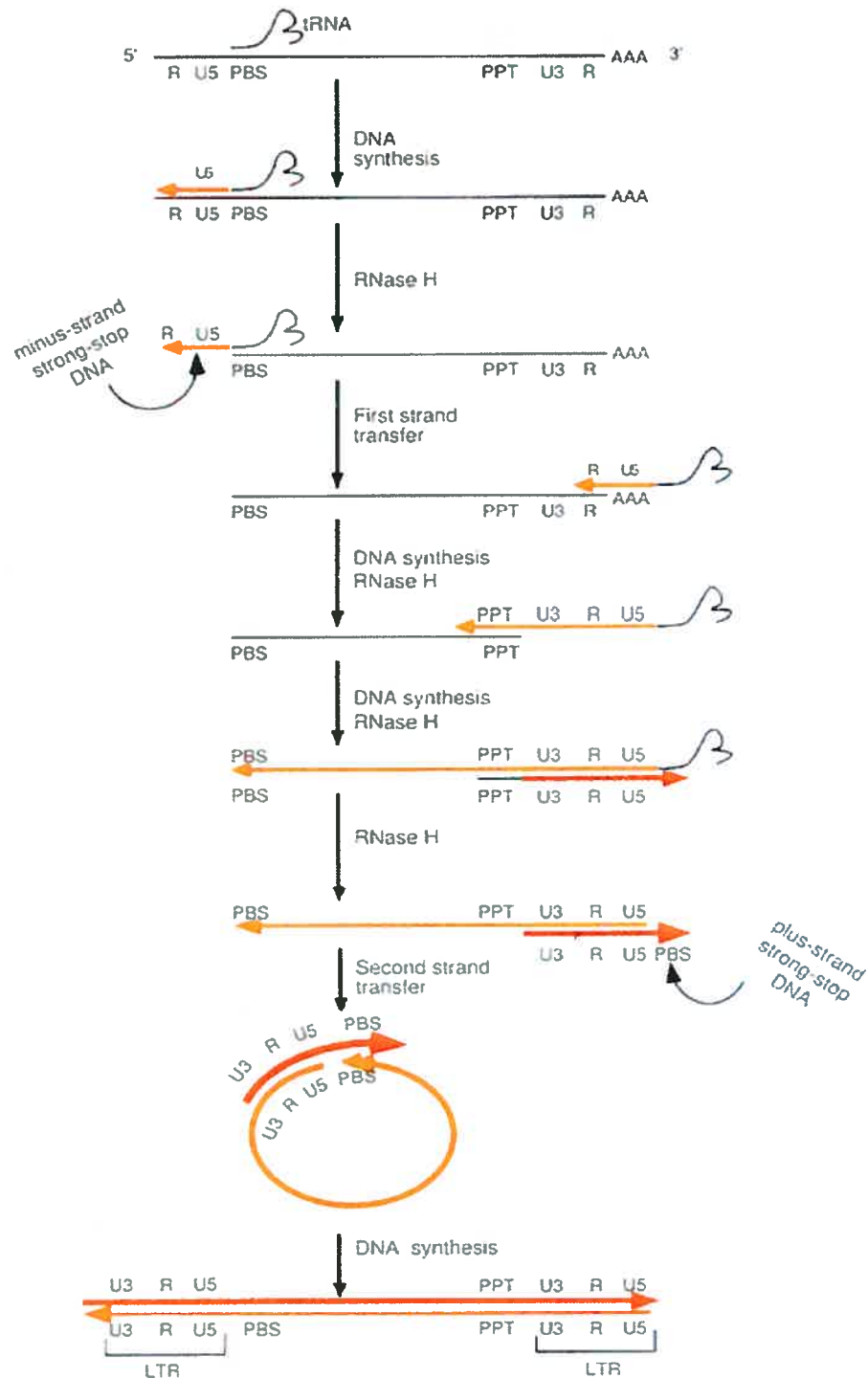


Figure 6 : Mécanisme moléculaire de l'étape de transcription inverse du génome du VIH-1. La transcriptase inverse initie la synthèse du premier brin d'ADN suite à la liaison de l'amorce ARN^{lys}. Par la suite, l'activité RNaseH de la transcriptase inverse induit la dégradation du brin d'ARN des complexes ARN/ADN. Dans le but de générer un ADN double brin, la transcriptase inverse initiera de multiples transferts de brins en utilisant les séquences répétées (R) présentes aux extrémités 5' et 3' du génome ARN. Finalement, la transcriptase inverse permettra l'obtention d'un hétéroduplexe d'ADN qui pourra par la suite être intégré au niveau de l'ADN génomique cellulaire. (Figure provenant de *Rétrovirus*, Coffin, John M. ; Hugues, Stephen H. ; Varmus, Harold E. Plainview (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press ; c1997)

5.3 Import nucléaire et intégration de l'ADN viral

Suite à la transcription inverse du génome viral ARN en ADN, pour qu'il y ait une infection productive, il doit y avoir intégration du génome viral ADN au chromosome cellulaire. Pour ce faire, le complexe de pré-intégration (PIC ayant une taille de 56 nm), composé de l'hybride ADN-ADN associé aux protéines de la MA, RT, IN et Vpr, doit entrer à l'intérieur du noyau cellulaire. Étant donné le fait que le VIH-1 est en mesure d'infecter des cellules en arrêt de division et que le pore nucléaire ne laisse entrer que des molécules ayant un diamètre d'environ 25 à 40 nm seulement, ce virus a évolué de manière à contourner le problème de l'entrée au noyau (220, 243). En effet, trois protéines virales ont été identifiées comme étant importantes dans le processus de l'import nucléaire, soit les protéines MA, IN, Vpr ainsi que l'ADN viral en soi. Cependant, ce processus est encore mal compris. Néanmoins, il est connu que des signaux de localisation nucléaire (NLS) seraient importants pour franchir la barrière du noyau cellulaire. Certaines études ont effectivement montrées que la protéine MA possède un NLS dans sa région N-terminale qui serait responsable du ciblage du PIC vers le noyau (46, 317), bien qu'il persiste une certaine controverse (109, 261). La protéine de la MA possède aussi un second NLS situé dans la portion C-terminale qui pourrait être impliqué dans l'import nucléaire (137). Une autre protéine qui semble avoir un rôle à jouer dans ce processus est la protéine accessoire Vpr. Il a effectivement été démontré que malgré l'absence de NLS au niveau de la séquence de Vpr, celle-ci comporte des séquences qui seraient importantes pour le ciblage de protéines de fusion au niveau du complexe du pore nucléaire (NPC) (252) et interagirait directement avec l'importine α (253) et la nucléoporine hCG1 (104, 184). Il semble qu'une structure d'ADN produite lors de la transcription inverse, le « central DNA flap », pourrait aussi agir comme un signal d'import nucléaire (335). Finalement, la protéine de l'intégrase possède des signaux non classiques de localisation nucléaire qui seraient nécessaires à l'accumulation des PICs au niveau du noyau (40, 114).

5.3.1 Intégrase (IN)

L'intégration de l'ADN viral au chromosome cellulaire est induit par la protéine virale de l'intégrase (IN) et se fait généralement à des sites qui sont hautement transcrits par l'ARN polymérase II (ARN polII) (20, 275). L'IN est une protéine de 32 kDa obtenue suite au clivage protéolytique du précurseur Gag-Pol par la protéase virale et est composée de trois différents domaines, soit le domaine C-terminal, le domaine N-terminal et une région nommée « core ». Le processus d'intégration débute avec l'enlèvement de deux nucléotides à chacune des extrémités 3' de l'ADN viral, ce qui permet d'exposer un groupement 3'OH nécessaire à l'appariement avec l'ADN cellulaire (50, 270). Par la suite, l'intégrase induit un clivage de l'ADN cellulaire, ce qui permet aux extrémités 3'OH virales de se joindre aux extrémités 5' cellulaires. Le processus d'intégration est complété par la machinerie de réparation cellulaire qui vient alors remplir les espaces entre l'ADN proviral intégré et le chromosome cellulaire.

5.4 Transcription des gènes viraux

Suite à l'intégration de l'ADN viral, le provirus sera utilisé afin de synthétiser les ARNs viraux. Ce processus de transcription ainsi que la synthèse des protéines virales impliquent diverses régions de l'ADN proviral, tel les LTRs ainsi que certaines des protéines virales, telle que Tat (transcriptional transactivator). La transcription des gènes viraux est la première des étapes tardives du cycle de réplication viral (voir figure 8).

5.4.1 Tat (Transactivator of transcription)

La transcription des ARNs à partir du provirus est caractérisée par deux phases distinctes, la première étant Tat-indépendante, la seconde Tat-dépendante. La transcription des ARN messagers (ARNm) viraux est initiée à la jonction de la région R et U3 du LTR retrouvé en 5' du génome proviral et ce, à partir de la région promotrice communément appelée boîte TATA. Cette région est nécessaire pour le recrutement du facteur de transcription cellulaire TFIID ainsi que pour le recrutement subséquent de l'ARN polymérase II cellulaire (265). En 5' de la boîte TATA sont retrouvés trois sites de liaison à *sp1* et deux sites de liaison à *NF-κB* (117). On y retrouve aussi une région dite modulatrice qui contient des sites de liaison à des facteurs de transcription tels que *LEF*, *Ets* et *USF* (265). Il a clairement été démontré qu'en absence de la protéine Tat, la transcription des ARNm simplement à partir des LTR est peu efficace (80, 101). La protéine Tat, qui fait 101 acides aminés, est connue pour augmenter l'efficacité de l'élongation des ARNm viraux nouvellement synthétisés en agissant sur une séquence d'ARN connue pour être la TAR ou « transactivatrice response element » (26). TAR est retrouvé à l'extrémité 5' des ARNm viraux et est composé d'une structure de type tige à l'extrémité de laquelle se trouve une séquence de trois pyrimidines. Cette séquence est impliquée au niveau de la liaison à un domaine riche en arginine de Tat. On retrouve aussi une région de type boucle composée de six nucléotides riche en guanine qui est impliquée au niveau de la liaison à la cycline cellulaire T1 (*cycT1*). Cette interaction avec *cycT1*, qui fait partie d'un complexe hétérodimérique comprenant un membre de la famille des kinases cycline dépendantes *CDK9*, permettra ultimement de phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN pol II, ce qui aura pour effet d'augmenter drastiquement son activité enzymatique. En effet, le complexe *cycT1/CDK9* fait lui-même partie d'un large complexe protéique nommé *P-TEFβ* (positive transcription elongation factor b) qui s'avère être en fait un cofacteur d'élongation lors de la transcription par l'ARN pol II (123). Des études ont démontré que Tat serait impliqué non seulement au niveau de la transcription, mais aurait aussi un rôle à jouer au niveau de l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (257). Tat serait aussi impliqué dans la répression de la transcription du CMH-I et de la β 2-microglobuline. Cette répression aurait lieu suite à l'interaction de Tat avec un composant du complexe TFIID, soit *TAF1*, et impliquerait la région C-terminale de Tat (43, 59, 153). Tat est aussi en mesure de modifier la chromatine en recrutant

des histones acétyltransférase au niveau du promoteur viral, facilitant l'acétylation des histones H3 et H4 à certaines régions nucléosomales (199).

5.5 Transport des ARN viraux dans le cytoplasme

Chez le VIH-1, on retrouve trois classes d'ARNm viraux. On retrouve tout d'abord les ARNm non-épissés, d'une longueur de 9 kb, qui codent pour les précurseurs Gag-Pol ainsi que pour Gag ; ces ARNm seront incorporés dans les particules virales néo-synthétisées. Par la suite, on retrouve les ARNm partiellement épissés, d'une longueur d'environ 5 kb, codant pour les protéines Env, Vpu, Vpr et Vif. Ces ARNm ainsi que les ARNm non-épissés seront donc produits de manière tardive lors du cycle de réplication du VIH-1. Enfin, les ARNm multi-épissés, d'une longueur variant de 1,7 à 2,0 kb, codent pour les protéines produites précocement lors du cycle de réplication viral, soit Rev, Nef et Tat (67, 108). Tous les ARNm viraux comportent des séquences de rétention nucléaires. Étant donné que seuls les ARNm cellulaires et viraux totalement épissés sont transportés efficacement du noyau vers le cytoplasme pour y être traduits et que le VIH-1 compte de nombreux ARNm épissés une seule fois ou non-épissés, celui-ci a dû évoluer de manière à ce qu'il y ait exportation des ARNm non- et mono-épissés dans le cytoplasme aussi bien pour les ARNm totalement épissés. Cet obstacle est surmonté par la protéine précoce Rev et à l'aide d'une séquence retrouvée à l'intérieur des ARN, soit la séquence RRE (« Rev Responsive Element ») (67). La séquence RRE, d'une longueur de 240 nucléotides, forme une structure secondaire permettant la liaison à Rev et est retrouvée dans le gène *env* chez les ARNm mono- et multi-épissés (67, 204, 267). Ainsi, lors de la liaison du RRE à Rev, il y a exportation de ces ARNm au cytoplasme, probablement suite au masquage de la séquence de localisation nucléaire et à l'exposition de la séquence d'exportation nucléaire (144). Rev est donc une protéine précoce essentielle à l'exportation des ARNm non épissés et partiellement épissés et permettra la traduction de ces ARNm au niveau du cytoplasme (203).

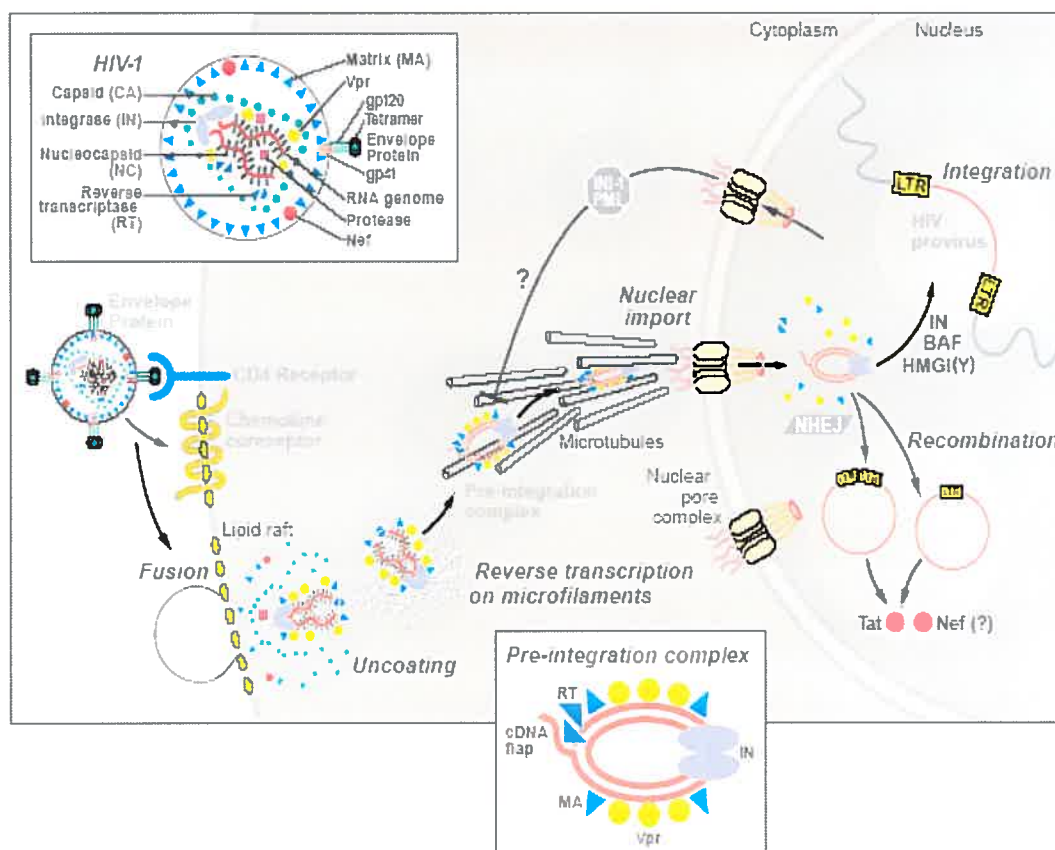


Figure 7 : Description des étapes précoces de l'infection par le VIH-1. L'interaction entre la sous-unité de surface du VIH-1, la gp120, et la molécule de la surface cellulaire, le CD4, ainsi qu'avec les récepteurs de chimiokines, le CCR5 ou le CXCR4 mène à un changement conformationnel permettant à la sous-unité transmembranaire de l'enveloppe du VIH-1, la gp41, d'induire la fusion des membranes virales et cellulaires menant ultimement à la décapsidation, la rétrotranscription du génome ARN, l'importation du complexe de pré-intégration au niveau du noyau cellulaire et finalement, l'intégration du génome ADN au niveau de l'ADN cellulaire. (Figure reproduite de Greene, W.C. and Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.*8(7); 673-680)

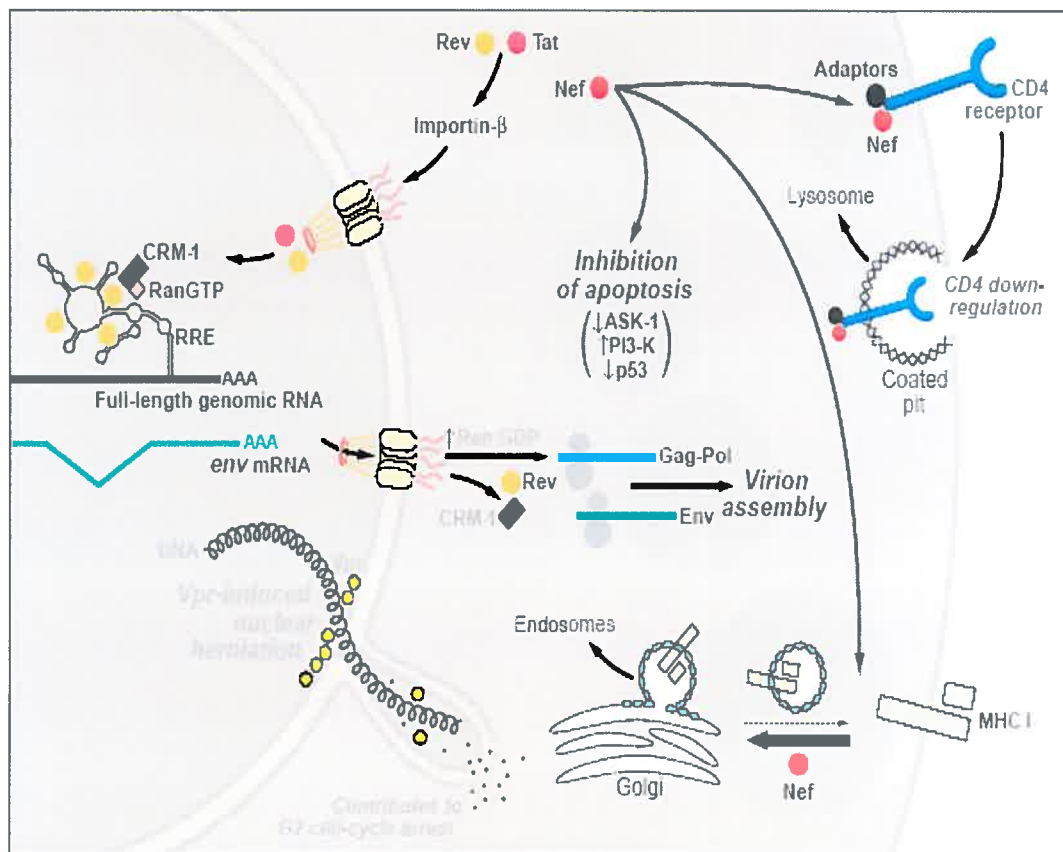


Figure 8 : Schématisation des étapes tardives de l'infection par le VIH-1. Les étapes tardives mènent ultimement à l'assemblage de nouvelles particules virales infectieuses. Sont mis en évidence les rôles principaux de protéines tardives impliquées dans l'optimisation de la réplication virale telle que la protéine Nef, qui régule négativement les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC-I) ainsi que les molécules CD4, en plus d'inhiber l'apoptose. La protéine Vpr a un rôle majeur dans l'arrêt du cycle cellulaire en G2 chez les cellules infectées alors que la protéine Rev promouvoit l'exportation des ARNm viraux qui n'ont pas été complètement épissés. Ces transcrits sont essentiels à la production d'enzymes et de protéines de structures permettant la production de nouveaux virions. (Figure reproduite de Greene, W.C. and Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell : Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.*8(7); 673-680)

5.5.1 Rev (Regulator of expression of viral proteins)

Rev est une phosphoprotéine de 19 kDa composée de deux domaines fonctionnels distincts (249). Le domaine N-terminal est constitué d'une séquence riche en arginine et est nécessaire à la liaison à l'ARN via l'interaction avec le RRE. Ce domaine contient aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS). Le second domaine, riche en leucine, est nécessaire à l'exportation des ARNm du noyau vers le cytoplasme grâce à une séquence d'exportation nucléaire (NES). La présence de ces deux types de signaux permet à la protéine Rev de se déplacer constamment du noyau vers le cytoplasme et inversement, lui permettant ainsi d'interagir avec le RRE des ARNm non- et mono-épissés nouvellement synthétisés au noyau, permettant ainsi leur exportation subséquente lors de la phase tardive de la réplication (67). En effet, suite au transport de Rev au noyau, il y aura multimérisation de celle-ci au niveau du RRE par un processus impliquant une liaison de haute affinité ainsi que le masquage de la NLS, ce qui permet l'exportation des complexes Rev-RRE (144, 204, 310). L'exportation de ces complexes implique aussi la séquence NES qui permet l'interaction de Rev avec des facteurs d'exportation nucléaire tel que Crm1, une protéine cellulaire agissant à titre de récepteur pour les protéines ayant un NES, eIF-5A, un facteur d'initiation eucaryote et SAM68, une protéine associée à Src lors de la mitose (94, 103, 113, 192, 219).

5.6 Synthèse des protéines accessoires

Malgré le fait que les protéines dites accessoires ne soient pas nécessaires à la réplication du VIH-1 *in vitro*, il a été démontré que les protéines accessoires Nef, Vpr, Vif et Vpu sont importantes à la fois pour la réplication et la pathogenèse chez l'hôte infecté. En effet, certaines études ont démontré que la présence et/ou l'absence de ces protéines pouvait grandement influencer le cours et la progression de la maladie (38, 97, 302).

5.6.1 Nef (Negative factor)

Nef est une protéine de 27 kDa qui est produite abondamment durant la phase précoce du cycle de réplication. Elle est produite à partir d'un ARNm totalement épissé et ainsi, ne requiert pas l'intervention de Rev pour être exportée vers le cytoplasme. Des études ont démontré que cette protéine était hautement impliquée dans la pathogenèse et la réplication du virus puisque sa délétion ou certaines mutations sont associées à une diminution de la progression de la maladie vers le stade SIDA, ainsi qu'à une augmentation de la survie des patients infectés avec ces souches virales (LTNP ou « long term non-progressor ») (82, 172, 210). Nef est myristylée à sa portion N-terminale, ce qui permet son ciblage à la membrane plasmique (18). On lui connaît quatre fonctions dont la première et l'une des plus étudiées est la régulation négative de plusieurs protéines cellulaires de surface telles que CD4 (118), CD8 (297), CD28 (304), CMH-I (284) et CMH-II (274). La fonction de régulation négative du CD4 par Nef implique l'accélération de l'endocytose de la molécule CD4 retrouvée à la surface cellulaire et sa

dégradation subséquente au niveau des lysosomes. Ceci s'effectue suite à l'association de Nef avec des adaptines (AP) et la sous-unité régulatrice de l'ATPase vacuolaire (v-ATPase). Nef serait par la suite en mesure de recruter indirectement β -COP, ce qui aurait pour conséquence de diriger le CD4 vers les voies de dégradation lysosomales (18). Dans ce processus, il semblerait que Nef agit de manière à permettre la dissociation entre CD4 et p56Lck, complexe qui prévient normalement l'internalisation du CD4 (79). La régulation négative des molécules du CMH-I à la surface des cellules par Nef implique aussi leur endocytose suite à l'interaction entre Nef, le complexe PACS-1/AP-1 et la PI3 kinase (284). En effet, cette interaction mène au recrutement de la voie d'endocytose ARF6 et permet ainsi la diminution du CMH-I à la surface des cellules infectées, ce qui aura pour conséquence de protéger les cellules infectées de la réponse des cellules lymphocytaires T cytotoxiques (CTL) et d'augmenter la production virale. Nef est aussi reconnue comme étant capable d'interférer avec les voies de transduction de signal. En effet, le groupement myristylé en N-terminal de Nef ainsi qu'une région riche en proline lui permet de s'associer à la membrane au niveau de microdomaines appelés « lipid raft », ou radeaux lipidiques, au niveau desquels on retrouve de nombreux médiateurs de signaux (320). De plus, il semble que Nef, en interagissant avec une protéine kinase PAK-2, contribue à l'activation des cellules infectées (258). En troisième lieu, dû à son incorporation dans les particules virales et à sa capacité de remodelage de l'actine permettant au génome viral de pénétrer la barrière du réseau cortical d'actine, Nef augmente l'infectivité et la réplication des virions (53, 64). En effet, il semble que tôt lors de l'infection, Nef permet l'accumulation d'ADN viral (64). Finalement, Nef est impliqué au niveau de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales grâce à la régulation du trafic du cholestérol (55). Il a été montré que Nef promouvait la formation de complexes multiprotéiques permettant le recrutement de protéines cellulaires adaptatrices, qui seraient nécessaires au bon fonctionnement des voies de transport des vésicules intracellulaires (266). En effet, il semble que Nef ait des effets pléiotropiques sur les voies sécrétoires et d'endocytose, ce qui permettrait la formation d'une plateforme d'assemblage virale (266).

5.6.2 Vif (Viral infectivity factor)

Vif est une phosphoprotéine de 192 aa qui est hautement exprimée dans le cytoplasme des cellules infectées, soit libre ou associée à la membrane (52). De plus, elle est aussi retrouvée au niveau des particules virales (entre 7 à 20 molécules/virion) (52). Vif est connue pour augmenter l'infectivité des particules virales en contrecarrant les effets d'un facteur cellulaire restrictif, soit APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptid-like 3G ») dans les cellules dites non permissives à l'infection (140, 301). APOBEC3G (CEM15) fait partie de la famille des cytidines déaminases dont le rôle est de prévenir la synthèse virale suite à la déamination des déoxycytidines dans le brin négatif d'ADNc viral, lors du processus de transcription inverse (139, 185, 205, 331). En effet, ce processus augmente la production de

codons stop ainsi que la mutation de cytidine (C) vers uracile (A), entraînant une absence d'infectivité des particules virales produites ou l'élimination de ces ADNc par la machinerie de réparation cellulaire (331, 336). En fait, APOBEC3G est incorporée dans les virions suite à son interaction avec Gag (13, 61, 273) et l'ARN viral (273, 334). La liaison de Vif à APOBEC3G, entraîne la polyubiquitination du complexe, le recrutement d'une E3 ligase et la dégradation ultérieure du complexe par le système ubiquitine-protéasome cellulaire (211, 288, 295). Vif serait aussi responsable d'une diminution de la synthèse de APOBEC3G (167, 295, 296). En plus de contrecarrer les effets d'APOBEC3G, Vif joue un rôle au niveau de la stabilisation du complexe nucléoprotéique viral (146, 151, 235, 290) et permettrait aussi d'augmenter le rythme de polymérisation de la RT (56).

5.6.3 Vpr (Viral protein R)

Vpr est une petite protéine basique de 14 kDa qui est produite tardivement dans le cycle de réplication viral. Elle est composée de trois hélices α repliées autour d'un centre hydrophobique, connectées entre elles par des structures en forme de boucles (221). Le domaine N-terminal, flexible, est chargé négativement alors que le domaine C-terminal, qui comporte une région riche en arginine, est chargé positivement. Sa localisation cellulaire est tant nucléaire que périnucléaire (197) et on peut aussi la retrouver dans le sérum des patients infectés. Cette protéine multifonctionnelle a été hautement étudiée et semble avoir moult fonctions d'importance dans la pathogenèse du VIH-1. En premier lieu, Vpr est incorporée dans les particules virales, à raison d'environ 275 molécules par virion, via une interaction avec la région C-terminale riche en leucine de p6^{Gag} du précurseur Pr55^{Gag} (5, 162, 178, 227). Ainsi, malgré le fait que Vpr soit une protéine tardivement produite, sa forme associée aux virions joue un rôle précoce dans l'import du PIC au noyau des cellules en arrêt de division (72, 142). Cette fonction serait due à la capacité de l'hélice α retrouvée en N-terminale de Vpr de se lier à l'une des composantes du pore nucléaire, soit l'importine α (171). D'autres études ont aussi montré que Vpr serait en mesure de créer des ruptures transitoires de l'enveloppe nucléaire, permettant ainsi l'entrée du PIC au noyau (81, 286). Vpr joue aussi un rôle au niveau de l'arrêt de cycle en phase G2 du cycle cellulaire, propriété qui serait attribuable à différents mécanismes induit par Vpr. L'un des mécanismes impliqués serait l'hyperphosphorylation de Cdc2 ainsi que l'hypophosphorylation de Cdc25, des protéines régulatrices de la progression du cycle cellulaire au point de contrôle G2/M, qui sont ainsi sous leur forme inactive (141, 165, 260). Il est aussi possible que Vpr induit l'arrêt en G2 par une voie sensible aux dommages fait à l'ADN et qui impliquerait la protéine cellulaire ATR (250, 268). Étant donné que les LTRs du VIH-1 sont plus actifs à la phase G2 du cycle cellulaire, il est possible que l'induction de cet arrêt par Vpr soit nécessaire à la création d'un environnement favorable à la transcription et réplication virale (125). Vpr contribue aussi à la déplétion des cellules T CD4⁺ dû à sa capacité à induire l'apoptose des cellules infectées via la voie mitochondriale apoptotique (161). En effet, Vpr est

en mesure de lier ANT (42, 160, 161), une protéine cellulaire retrouvée dans la membrane interne mitochondriale, et induirait la dépolarisation de la membrane, ce qui a pour ultime conséquence le relâchement de facteurs apoptotiques, telle la caspase 9 (229). Il est à noter que la mutation de l'arginine en position 77 de Vpr est associée à un développement moins agressif de la maladie, les patients arborant des souches avec cette mutation étant associés à des cohortes de LTNPs.

5.6.4 Vpu (Viral protein U)

Le gène *vpu* code pour une phosphoprotéine transmembranaire de 81 a.a. (16 kDa) retrouvée chez le VIH-1 (70) et certains isolats du VIS, tel que VIS_{cpz} (chimpanzé) (156), VIS_{gsn} (« greater spot-nose monkey ») (75), VIS_{mon} (« mona monkey ») et VIS_{mus} (« mustached monkey ») (74), mais absente des isolats du VIH-2. La protéine Vpu est obtenue suite à la traduction d'un ARNm bicistronique codant également pour la protéine Env et ce, tardivement dans le cycle de réplication. En effet, il s'agit d'une protéine mono-épissée nécessitant la présence de Rev pour être exportée dans le cytoplasme (285). On reconnaît deux fonctions importantes à la protéine Vpu, soit l'augmentation de la relâche des particules virales (302) et la dégradation du CD4 néo-synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (323). Certaines études tendent à démontrer son implication au niveau de la régulation négative des molécules du CMH-I (87, 169) ainsi que dans l'augmentation de l'apoptose chez les cellules infectées (10, 60). Cette dernière fonction est attribuable à l'inhibition de l'activité de NF-κB par Vpu (10, 60). La structure et les fonctions de Vpu seront discutées plus en détails dans une section ultérieure.

5.7 Assemblage et maturation des particules virales

Une fois que les protéines nécessaires à la production de nouvelles particules virales sont synthétisées, il y a assemblage des virions à la membrane plasmique où le bourgeonnement subséquent des virions nouvellement assemblés aura lieu. Des études récentes démontrent qu'il est possible qu'une partie de l'assemblage puisse avoir lieu au niveau des corps multivésiculaires (MVB ou « multivesicular bodies ») avant d'être redirigé vers la membrane plasmique (246, 262). L'assemblage des particules virales se fait grâce au précurseur Gag, soit Pr55^{Gag} (107, 129).

5.7.1 Gag

Gag est synthétisée à partir des ARN viraux sous forme d'un précurseur polyprotéique de 55 kDa, soit Pr55^{Gag}. Ce précurseur, composé des régions MA (p17), CA (p24), p2, NC (p7), p1 et p6 (N-terminal vers C-terminal), comporte tous les déterminants nécessaires à l'assemblage des particules virales. En effet, le précurseur Pr55^{Gag} est composé de différents domaines dont le premier, le domaine M, est responsable du ciblage de Gag et sa liaison subséquente à la membrane plasmique. Ce domaine est constitué des 31 premiers acides aminés de la région MA

ainsi que d'un résidu myristylé au niveau de la première glycine en N-terminal. Le second domaine, le domaine I ou domaine d'interaction, est nécessaire à la multimérisation de Gag. Ce domaine est composé à la fois de régions retrouvées dans la portion C-terminale de la CA (6, 30), ainsi que des régions de la NC (24). Un des derniers événements du processus d'assemblage est le bourgeonnement ou relâche des particules virales, étape qui implique le domaine tardif ou domaine L. Ce domaine comporte une région hautement conservée nécessaire à la relâche des particules virales, appelée motif PTAP, et est situé dans la région N-terminale de p6 (131, 155). Une dernière étape nécessaire à la production de particules virales matures et infectieuses se produit durant ou peu de temps après le bourgeonnement, et consiste en le clivage du précurseur Pr55^{Gag} par la protéase virale (PR) (107).

5.7.2 Gag-Pol

Le précurseur Pr160^{Gag-Pol} code pour le gène *pol* qui, lorsque clivé, résulte en les protéines IN, PR et RT. Le précurseur de 160 kDa Pr160^{Gag-Pol} est synthétisé suite à un changement de cadre de lecture lors de la synthèse de Pr55^{Gag} (108). Le changement de cadre de lecture s'effectue dans une région de chevauchement des gènes Gag et Pol, plus précisément au codon leucine (159). Il s'agit d'un mécanisme que le virus a développé afin de minimiser l'expression de Pol afin qu'elle soit d'environ 5 à 10% de celle de Gag. Pr160^{Gag-Pol} est incorporé dans les virions et est ciblé et ancré à la membrane de la même manière que le précurseur Pr55^{Gag}, soit via l'interaction entre un groupement myristyle situé sur la glycine en N-terminale du précurseur et la membrane en soi (108, 175).

5.7.2.1 Protéase virale (PR)

La protéase virale est absolument essentielle à la maturation des virions et est nécessaire au clivage séquentiel des précurseurs Pr160^{Gag-Pol} et Pr55^{Gag}. Sa forme active est retrouvée sous forme de dimère dont le site actif comporte deux résidus aspartate (Asp) importants pour catalyser l'hydrolyse d'un lien peptidique dans la protéine cible. Il a aussi été démontré que la PR est active dans le contexte de précurseur (83, 225). C'est lors du bourgeonnement des particules virales que la protéase catalyse son auto-clivage à partir du précurseur Pr160^{Gag-Pol} et c'est sous sa forme de dimère qu'elle va induire le clivage des autres enzymes virales codées dans ledit précurseur. Il y a par la suite clivage du précurseur Pr55^{Gag}, menant à la production de particules virales matures (175).

6. Assemblage, bourgeonnement et sortie des particules virales

6.1 Étapes de l'assemblage viral

L'assemblage des particules virales s'effectue suite à la synthèse de tous les composants viraux. Comme mentionné précédemment l'assemblage des particules virales se fait principalement grâce au précurseur Gag. En effet, il est connu qu'en absence de tout autres constituants viraux, Pr55^{Gag} est suffisant pour la formation de particules virales non infectieuses appelées VLP (« virus-like particles ») (107) et ce, même en absence de protéase virale (132). L'assemblage se fera suite à une série d'événements succincts, débutant avec le ciblage de Gag à la membrane plasmique suivi de la liaison de Gag à la membrane en soi, la formation d'oligomères Gag-Gag, l'encapsidation du génome viral ARN, l'association avec les glycoprotéines de l'enveloppe et finalement, le bourgeonnement des particules virales infectieuses (voir figure 9).

6.1.1 Association de Gag à la membrane plasmique

Il est bien établi que le ciblage de Gag à la membrane plasmique est induit par la portion N-terminale du précurseur Pr55^{Gag}, soit MA et plus particulièrement les 31 premiers a.a., qui forment la région dénommée domaine M. Ce domaine est constitué d'une région acétylée ainsi que d'une région riche en résidus basiques, toutes deux nécessaires au ciblage de Gag à la membrane plasmique (132, 186, 294). Les résidus basiques sont retrouvés entre les a.a. 17 à 31 de MA et la forte proportion de résidus chargés positivement permettrait d'interagir avec les phospholipides retrouvés au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, ce qui permet ainsi de stabiliser la liaison (108, 149, 214). Une modification co-traductionnelle, soit l'ajout d'un groupe myristate au niveau du premier résidu glycine de la protéine (23, 124, 132), est nécessaire à l'insertion de Gag dans la membrane plasmique. Il a été montré que la mutation des résidus 84 à 88 de la MA entraîne une redirection de l'assemblage et de la maturation des virions vers des compartiments intracellulaires (110, 237). Il semblerait que la capacité de trimérisation de MA soit aussi impliquée dans l'insertion de Gag à la membrane, suite à la formation d'une surface bipartite de liaison qui permettrait l'interaction entre les résidus basiques et le groupement myristylé de MA (149).

Encore peu de choses sont connues en ce qui concerne l'assemblage préférentiel de Gag au niveau de la membrane plasmique plutôt qu'un ciblage vers les membranes intracellulaires. Il est cependant connu que l'assemblage à la membrane plasmique se ferait au niveau de microdomaines riches en cholestérol, en sphingolmyéline, en glycosphingolipides ainsi qu'en glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) appelés radeaux lipidiques ou « lipid rafts » (65). En effet, les particules virales assemblées à la membrane plasmique incorporent certaines protéines retrouvées dans les radeaux lipidiques (52, 248, 251) et ont un niveau élevé de cholestérol et de sphingolipide (14, 247). Cependant, de plus en plus d'évidences tendent à démontrer que le

6.1.2 Multimérisation de Gag

La formation des particules virales ne peut avoir lieu en absence de multimérisation des molécules de Gag. Il est en effet connu que seul Gag est nécessaire à la formation de particules similaires aux virions (VLP) *in vitro* (54, 224). De multiples domaines de Gag sont sollicités afin d'accomplir le processus dynamique de la formation de particules virales où cette propriété intrinsèque de Gag, qu'est son oligomérisation, a une grande importance. Il est à noter que les domaines impliqués dans le ciblage de Gag à la membrane plasmique ne sont pas nécessaires à la multimérisation de Gag, mais pourraient solidifier l'interaction entre les molécules de Gag. La première région importante pour obtenir de fortes interactions Gag-Gag est la partie C-terminale de CA. Certaines études ont démontré que l'utilisation de CA purifiée ou de fusion CA-NC permettait l'établissement de structures similaires au noyau dense (« core-like structure ») (93). Cette région contribue d'au moins trois façons à la multimérisation de Gag. Tout d'abord, la portion C-terminale de CA comporte une région hydrophobe qui permet la formation d'une interface de dimérisation. Ensuite, un groupe a récemment montré l'implication d'une séquence riche en glycine, soit le motif GVGGP, pour la production de particules virales. Ce motif interviendrait tant au niveau de l'association de Gag à la membrane qu'au niveau de la multimérisation et de la production virale. Effectivement, une mutation à l'intérieur de ce motif entraîne une diminution de l'association de Gag aux membranes, une diminution de sa capacité à oligomériser ainsi qu'une diminution de la production de virions (193). De plus, une séquence conservée de 11 a.a. dans la portion C-terminale de CA serait importante pour la relâche des particules virales, étant donné qu'une mutation dans cette région entraîne une diminution de relâche et d'infectivité (217). Un second domaine impliqué dans l'oligomérisation de Gag est NC. Ce domaine est très important pour la multimérisation de Gag puisque la délétion de cette région cause une forte diminution des interactions Gag-Gag (49, 105, 236) en plus de diminuer grandement l'assemblage et la production de particules virales (58, 164).

Le dernier domaine impliqué dans la multimérisation de Gag est MA. En effet, en plus de son importance dans le ciblage de Gag à la membrane plasmique, des études démontrent que lorsque MA est retrouvée sous sa forme trimérique, il y a exposition du groupement myristate impliqué dans l'ancrage à la membrane (306). Toutefois, d'autres études ont montrées que Gag était en mesure d'oligomériser en absence de myristillation, ce qui pourrait vouloir dire que l'assemblage débute au niveau du cytoplasme pour prendre fin au niveau de la membrane plasmique (223). Ce modèle dit « myristoyl switch » a aussi été appuyé par un second groupe qui démontrait que lorsque Gag est retrouvée sous forme monomérique dans le cytoplasme, son groupement myristillé est masqué par la MA. Une abondance de Gag dans le cytoplasme entraînerait une augmentation de la proportion de Gag appelée à multimériser, dévoilant ainsi le groupe myristyl qui serait alors un signal pour l'association aux membranes (245).

6.1.3 Bourgeonnement des particules virales

Pour terminer le processus de l'assemblage des particules virales, les virus doivent se détacher de la membrane plasmique de la cellule infectée. Le bourgeonnement, que l'on croyait être un processus passif au départ, est maintenant reconnu pour être un processus dynamique nécessitant la présence de séquences virales en plus de nécessiter la présence de divers facteurs cellulaires. Les différentes voies de relâche virale possibles sont illustrées à la figure 10.

Chez le VIH-1, l'efficacité du bourgeonnement est en partie contrôlée par des séquences retrouvées dans le domaine $p6^{Gag}$. Des études de mutagenèse ont démontré que des mutations au niveau d'une séquence hautement conservée de $p6^{Gag}$, soit un motif Pro-Thr-Ala-Pro (PTAP), entraînent une accumulation des particules virales au niveau de la membrane plasmique sans qu'elles soient toutefois relâchées (131, 155). Cette région a donc été nommée domaine L ou « late domain » dû à son implication tardive dans la relâche des virions. Il existe deux types de motifs supplémentaires retrouvés dans les domaines L de différents virus, soit le motif PPxY et le motif YxxL (107).

Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que le bourgeonnement et la relâche des particules virales impliqueraient le recrutement de la machinerie d'ubiquitination cellulaire par le domaine L de $p6^{Gag}$. En effet, l'ubiquitine peut servir comme molécule régulatrice des protéines cargo retrouvées au niveau des MVBs et régule aussi les activités de la machinerie de trafic cellulaire en soi (148). Tout d'abord, il a été montré que $p6$ peut être ubiquitiné (239) et que les niveaux d'ubiquitination de Gag peuvent être altérés par la présence du domaine L (213, 298). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome entraîne une diminution du bourgeonnement des particules virales probablement dû aux suites de la déplétion de la quantité d'ubiquitine libre dans la cellule (281, 298). Également, des mutations au niveau de l'ubiquitine elle-même entraînent une inhibition du bourgeonnement des virions (300). D'autres études ont aussi démontrées que le motif PTAP de $p6^{Gag}$ interagit directement avec le domaine N-terminal de Tsg101, une protéine cellulaire homologue de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2 : « ubiquitine-conjugating enzyme ») (316). De plus, lorsque Gag est exprimé dans les cellules infectées, il y a une redirection de la protéine Tsg101 au niveau du site d'assemblage (316).

Tsg101 est en mesure de s'assembler à un complexe de haut poids moléculaire, soit ESCRT-I, qui est normalement impliqué dans le ciblage des protéines vers les lysosomes soit via l'endocytose ou le transport vésiculaire (187). Diverses études ont démontré que la déplétion de Tsg101 (119), sa surexpression (126) ou encore l'inhibition directe des voies de transport vésiculaires (119) entraînent toutes une diminution marquée de la relâche des particules virales à des stades avancés du bourgeonnement. Toutefois, malgré la spécificité de la liaison entre le motif PTAP de $p6^{Gag}$ et Tsg101, celui-ci n'est pas suffisant pour expliquer entièrement la

fonction du domaine L. Il semblerait que certains résidus retrouvés à l'intérieur de la séquence de p6^{Gag} puissent agir en *trans* avec le motif PTAP pour augmenter le bourgeonnement et la relâche virale (212).

6.2 Interaction entre Gag et la protéine de l'enveloppe

La protéine de l'enveloppe doit être incorporée dans les particules virales afin que celles-ci complètent le processus d'assemblage. Bien que la totalité du processus d'incorporation de l'enveloppe dans les virions n'ait pas encore été totalement élucidé, de nombreuses évidences suggèrent l'importance de la portion MA du précurseur Pr55^{Gag} comme région-clé de cette incorporation. En effet, une interaction directe entre la queue cytoplasmique de la sous-unité transmembranaire gp41 et p17^{MA} a été rapportée dans un essai *in vitro* (326). De plus, des études de mutagenèse ont démontré que des mutations tant dans la région de la MA (332) que dans la queue cytoplasmique de gp41 (333) causent une diminution du niveau d'enveloppe incorporé dans les particules virales. D'ailleurs, la délétion des résidus 292 à 296 dans la queue cytoplasmique de gp41 est responsable d'une diminution de l'incorporation de Env dans les particules virales (228). Néanmoins, cet effet peut être contrecarré par la substitution d'une valine par une isoleucine en position 34 de MA, suggérant ainsi fortement une interaction entre ces deux parties (228). Inversement, il est possible de rétablir l'incorporation de l'enveloppe lorsque MA est mutée, à condition de tronquer la portion cytoplasmique de gp41 (228). De plus, un résidu tyrosine à la position 712 de la queue cytoplasmique de gp41 est connu pour être responsable du bourgeonnement polarisé des virions du côté basolatéral dans des cellules polarisées (194, 195). Dans ce système, l'utilisation de mutants de MA incapable d'interagir avec la protéine de l'enveloppe mène à une distribution non polarisée des particules virales, suggérant fortement un rôle pour l'interaction MA-Env dans la polarisation de la relâche virale (194). Aussi, une étude a démontré que la protéine cellulaire TIP47 (« tail-interacting protein of 47 kDa ») connue pour lier la protéine de l'enveloppe du VIH-1 (28), se lie aussi au domaine MA de la protéine Gag, formant ainsi un complexe trimérique (196). Ils ont ainsi démontré que des mutations au niveau de Gag qui empêchent son interaction avec TIP47 inhibent l'incorporation de l'enveloppe dans les virions, de même que l'infectivité des particules virales ainsi formées. Ceci indique que cette protéine cellulaire agirait comme un cofacteur essentiel à l'incorporation de Env dans les particules virales en permettant une association physique entre les protéines Env et Gag lors du processus de l'assemblage (196).

6.3 Voie endosomale de sortie du VIH-1

Malgré le fait que la relâche des particules virales à la membrane plasmique ait été extensivement étudiée, il est connu depuis fort longtemps que dans certains types cellulaires, le bourgeonnement viral peut se produire de façon intracellulaire (238). Le bourgeonnement intracellulaire des particules virales se produit au niveau des corps multivésiculaires (MVBs).

Ces MVBs font partis du système endosomal avec les vésicules d'endocytose primaires, les endosomes précoces (EE : « early endosomes »), tardifs (LE : « late endosomes ») et les lysosomes (84). De multiples interactions protéiques sont nécessaires à la formation des MVBs. Tout d'abord, trois complexes de la voie sécrétoire endosomal sont requis, soit ESCRT-I, -II et -III (ESCRT : « endosomal sorting complex required for transport ») (84). La présence d'une ATPase, VSP4A, est aussi absolument nécessaire à la formation des MVBs. En effet, en présence d'une protéine VPS4A défective pour l'activité d'hydrolyse de l'ATP, il y aura formation de compartiments de morphologie aberrante (21, 99). Le complexe ESCRT-I est formé de trois sous-unités comprenant les protéines Tsg101, VPS28, VPS37 (A-D) (168, 303). La portion C-terminale de Tsg101 est nécessaire à la fois à la liaison à VPS28 ainsi qu'à VPS37C qui, quant à lui, se lie aussi à VPS28 (92). On retrouve ensuite une protéine dite de classe E, soit AIP1, qui est en mesure de se lier avec le domaine N-terminal de Tsg101 via la séquence PSAP de AIP1. De plus, AIP1 se lie aussi à la protéine CHMP4 qui fait partie du complexe ESCRT-III. AIP1 permet donc qu'il y ait interaction entre ESCRT-I et -III et ce, seulement en présence d'une ATPase VPS4A fonctionnelle (299). L'un des complexes les plus importants dans la formation des MVBs est le complexe HRS (« hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate ») en ce sens qu'il recrute ESCRT-I et initie par le fait même la cascade des événements nécessaires à la formation des MVBs. Cette protéine est requise pour l'association de Tsg101 à la membrane via la liaison de son motif PSAP (319).

Il est connu que la relâche virale nécessite la liaison entre Tsg101, le motif PTAP de p6 et l'ubiquitine. Plusieurs études démontrent aussi qu'il y a association de Gag au niveau des corps multivésiculaires. En effet, la protéine AIP1 qui est impliquée dans la formation des MVBs, se lie à la portion C-terminale de p6^{Gag} (319), ce qui laisse croire que le VIH-1 pourrait accéder directement à la voie de formation des MVBs suite au recrutement de AIP1. De plus, il a été montré que des mutants dominants négatifs des protéines de la famille CHMP (299, 319) ainsi que des ATPases VPS4A et B (119, 319) sont de puissants inhibiteurs du bourgeonnement et de la relâche virale, en plus d'entraîner une redistribution de Gag vers des compartiments endosomaux aberrants. Ceci suggère fortement un rôle de ces protéines dans le bourgeonnement viral. Il est également connu que le complexe HRS joue un rôle crucial dans la formation des MVBs en recrutant le complexe ESCRT-I aux endosomes, et que le motif PSAP de HRS se lie directement à la portion N-terminale de Tsg101. Une hypothèse actuelle est que le VIH-1, en utilisant la séquence PTAP de p6^{Gag}, mimerait le recrutement de Tsg101 par HRS, activant ainsi les fonctions de HRS (255).

Le bourgeonnement intracellulaire s'effectue dans de multiples lignées cellulaires (233, 289, 319) et le site de relâche intracellulaire correspond aux MVBs. Par exemple, l'infection des macrophages par le VIH-1 mène à l'accumulation de virus dans des compartiments ayant les

caractéristiques des MVBs, qui sont donc positifs pour les marqueurs CD63, LAMP-1 et HLA-DR (259). D'ailleurs, les particules virales formées dans ces compartiments incorporent ces protéines membranaires (244). Les virions formés intracellulairement seraient ensuite relâchés dans le milieu extérieur suite à la fusion des compartiments de type MVBs avec la membrane plasmique, selon un processus d'exocytose (244, 259). Le bourgeonnement intracellulaire du VIH-1 a aussi été observé dans des lignées non-monocytaires, tel que dans les cellules 293T, HeLa et dans les lymphocytes T, où ils s'assemblent au niveau des endosomes tardifs et des MVBs (233, 319). À ce sujet, une étude récente de notre laboratoire suggère que certaines molécules du CMH-II permettraient de promouvoir l'assemblage et le bourgeonnement du VIH-1 au niveau des endosomes tardifs/MVBs, laissant ainsi croire qu'il s'agirait d'une voie normalement utilisée par le virus pour la production de virions dans les cellules exprimant normalement le CMH-II, tel que les macrophages (100). Effectivement, cette étude démontre que l'expression de HLA-DR dans des lignées cellulaires non-lymphoïdes permet l'induction de la relocalisation de Gag au niveau des compartiments intracellulaires étant positifs pour les marqueurs des endosomes tardifs/MVBs, en plus d'augmenter l'accumulation du nombre de particules virales infectieuses s'assemblant intracellulairement (100).

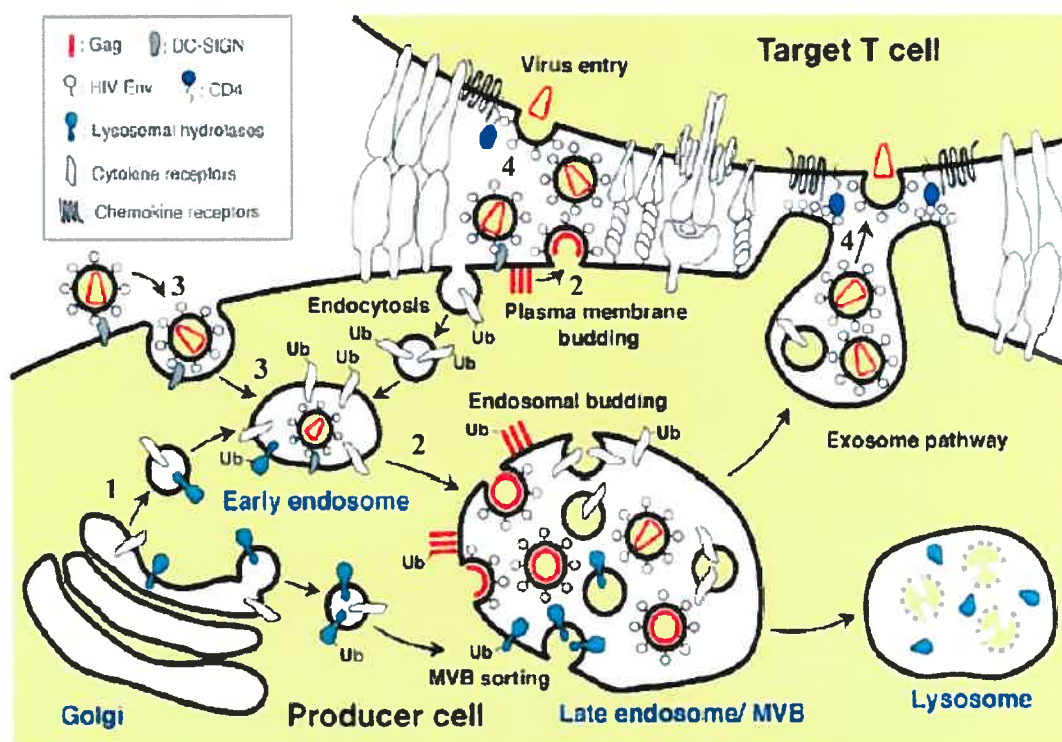


Figure 10 : Résumé des différents mécanismes de relâche possible du VIH-1. Ce schéma illustre 1) La voie normale de transport des molécules cellulaires en provenance du Golgi et de la membrane cellulaire vers les lysosomes, 2) Le bourgeonnement du VIH-1 à la fois à la membrane plasmique et aux MVB, 3) L'internalisation et le transport endosomal des particules virales via le récepteur DC-SIGN et 4) La relâche dirigée des particules virales au niveau de la synapse immunologique. (Figure reproduite de Eiji Morita and Wesley I. Sundquist. 2004. *Retrovirus budding. Annu. Rev. Cell Dev.* 20:395-425)

7. Structure et fonctions de la protéine accessoire Vpu

7.1 Domaines structuraux de Vpu

La protéine accessoire Vpu du VIH-1 est une phosphoprotéine transmembranaire de 81 a.a. (16 kDa) qui est en mesure de former des homo-oligomères (70, 202, 302). Vpu est constituée d'un domaine N-terminal hydrophobique transmembranaire ainsi que d'un domaine C-terminal hydrophile chargé, qui s'étend dans le cytoplasme (202, 324). Le domaine C-terminal comprend une séquence dodécapeptidique hautement conservée allant des résidus 47 à 58 au sein de laquelle on retrouve deux résidus sérines, en position 52 et 56, qui sont phosphorylées par une kinase ayant des similarités avec la caséine kinase II cellulaire (280, 282).

Des études de spectroscopie par résonance magnétique (NMR) ont tenté d'élaborer un modèle de la structure de Vpu. D'abord, le domaine cytosolique hydrophile est constitué de deux hélices amphipatiques jointes par une boucle flexible comprenant les deux résidus sérines conservés (voir figure 11). Cette région flexible serait orientée du côté opposé à la membrane dû aux résidus sérines phosphorylés. La première des deux hélices α du domaine cytoplasmique est retrouvée en position 37 à 51 et comprend tant des résidus hydrophobes, que des résidus chargés positivement et négativement (200, 325). Les résidus hydrophobes permettent la formation d'un point d'ancrage à la membrane alors que la portion hydrophile de l'hélice fait face au cytoplasme. Cette hélice est orientée parallèlement au plan de la membrane. La seconde hélice α est retrouvée au niveau des résidus 57 à 72, juste avant la queue terminale de Vpu qui s'étend des résidus 73 à 78. Son orientation par rapport au plan de la membrane est encore sujette à discussion étant donné que certaines études croient que cette hélice est, tout comme la première, parallèle au plan de la membrane (200, 207) alors que d'autres préconisent un modèle où cette hélice s'oriente de manière à s'éloigner de la membrane (37, 325). Il est à noter que l'orientation de la première hélice α n'est pas affectée par la présence des groupements phosphates au niveau des résidus sérine 52 et 56 (145). En ce qui concerne le domaine transmembranaire de Vpu, celui-ci est constitué d'une hélice α allant des résidus 9 à 27, qui est orienté avec un angle de 15-20° avec le plan de la membrane (207, 325).

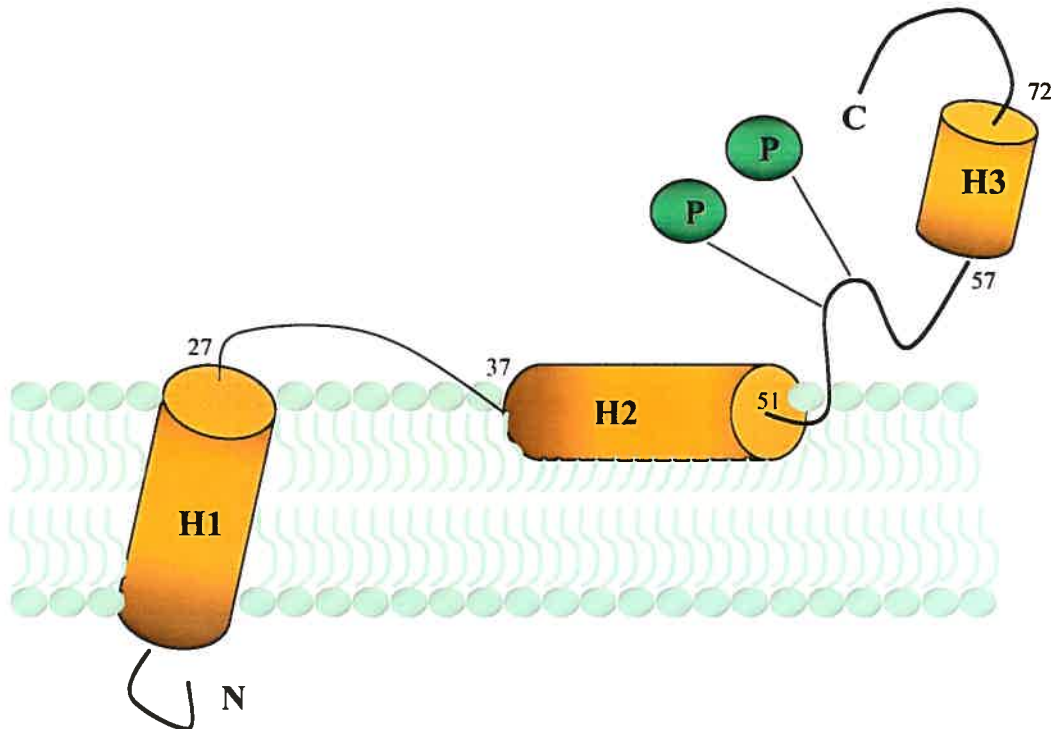


Figure 11 : Structure hypothétique de la protéine accessoire Vpu du VIH-1. Le domaine C-terminal de la protéine Vpu est un domaine hydrophile formé de deux hélices alpha jointes par une portion flexible comprenant un motif dodécapeptidique hautement conservé. Ce motif contient deux sérines qui sont phosphorylées par une caséine kinase cellulaire. Le domaine N-terminal de Vpu en est un hydrophobique et transmembranaire ayant des homologies de structure avec la protéine cellulaire TASK-1. Ce domaine serait impliqué dans la formation de canaux ioniques selon plusieurs modélisations par résonance magnétique nucléaire (NMR : Nuclear Magnetic Resonance). (Adaptée de Bour et al, 2003. The HIV-1 Vpu protein : a multifunctional enhancer of viral particles release. *Microbes Infect.* 5(11) ; 1029-1039.)

7.1.1 Polymorphisme du gène *vpu*

Très peu d'études se sont attardées au polymorphisme du gène *vpu* du VIH-1. Toutefois, le groupe de McCormick-Davis et ses collaborateurs a réalisé une importante étude regroupant 101 souches de VIH-1 du groupe M, provenant de diverses régions géographiques. Tout d'abord, il a été démontré que la longueur totale de la protéine Vpu varie de 77 acides aminés jusqu'à 96 acides aminés chez certains sous-types, avec une moyenne de 81 acides aminés (216). De ces 81 acides aminés, 10 résidus ont été trouvés invariables (12,3%), 26 résidus ont été considérés comme étant conservés (32,1%) dans plus de 95% des séquences et 9 résidus ne semblent pas conservés (216). Aussi, les analyses de séquences qu'ils ont effectuées ont permis d'identifier des résidus d'acides aminés conservés dans d'autres régions que le domaine hautement conservé de phosphorylation par la caséine kinase II, dans les sous-types provenant du groupe M (216). Effectivement, leur étude a montré que le résidu tryptophane retrouvé en position 23 du domaine transmembranaire de Vpu, le résidu glutamine situé en position 36 dans la première

hélice α ainsi que le résidu leucine retrouvé en position 64 sont des résidus hautement conservés (216). La comparaison de séquences du gène *vpu* du VIH-1 a aussi mené à l'identification de résidus d'acides aminés nettement conservés dont le résidu acide glutamique en position 51, le résidu acide aspartique en position 53, la glycine en position 54 et 59 ainsi que l'asparagine en position 55 (308). D'autre part, l'étude de McCormick-Davis a établi qu'il existe un motif LRLL retrouvé uniquement chez les isolats du sous-type C. Ce motif est situé dans la portion C-terminale du gène *vpu*, une région qui est généralement variable et qui chevauche le gène de l'enveloppe (216). Toutefois, les fonctions de la protéine Vpu provenant des divers isolats primaires n'ont pas été testées durant cette étude. Une autre étude s'est attardée sur la fréquence de détection d'une mutation qui entraîne l'apparition prématurée d'un codon stop au niveau du gène *vpu*, abolissant ainsi totalement ou partiellement l'expression de Vpu (177). En comparant plus de 200 séquences du VIH-1 provenant de différents sous-types (A à K ainsi que les CRF01_AE et CRF14_BG), ils ont déterminé que les isolats CRF01_AF ont un taux plus élevé de mutations causant l'apparition d'un codon stop prématuré, comparé aux isolats provenant d'autres sous-types, bien que ce type de mutation ait aussi été détectée chez des isolats de sous-types B (177). Ces mutations se produisent soit au niveau du codon d'initiation ou encore à la limite entre le domaine transmembranaire et cytoplasmique de Vpu (177). Selon cette étude, l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau du gène *vpu* serait responsable d'une augmentation de l'induction de l'apoptose des cellules infectées par les isolats CRF01_AE (176, 177). Une autre étude ayant utilisé des isolats de sous-types B du VIH-1, qui possédaient aussi un codon stop prématuré dans la séquence du gène *vpu*, rapporte que ces isolats semblent être plus efficaces pour la transmission cellule-cellule (136). Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires à la fois pour vérifier l'importance de ces phénomènes dans la pathogenèse du VIH-1, mais aussi pour établir si le polymorphisme du VIH-1 a un impact sur les autres fonctions de la protéine Vpu.

7.2 Fonctions de Vpu

Deux fonctions biologiques d'importance sont reconnues pour être dues à l'activité de Vpu durant l'infection au VIH-1. En premier lieu, la présence de Vpu permet d'augmenter la relâche des particules virales dans différents types cellulaires (278, 302, 307). Deuxièmement, Vpu est capable d'induire la dégradation du récepteur CD4 et potentiellement celle des molécules du CMH-I au niveau du réticulum endoplasmique (169, 323), bien que les recherches dans ce dernier domaine n'aient pas été poursuivies plus avant. L'expression de Vpu entraînerait aussi une augmentation de l'apoptose chez les cellules infectées (10, 60). Un schéma récapitulatif des principales fonctions biologiques de Vpu est proposé à la figure 12.

7.2.1 Augmentation de la relâche des particules virales

L'une des premières fonctions ayant été attribuée à Vpu est l'augmentation de la relâche virale dans les cellules infectées. Selon les études et les systèmes utilisés, cet effet en serait un d'environ 5 à 100 fois (231, 302, 307). En effet, en absence de Vpu, il est possible de remarquer une augmentation du bourgeonnement intracellulaire (174) et les virions qui sont retrouvés à la membrane plasmique semblent y rester attachés (328). De plus, il semble que Vpu soit aussi impliquée au niveau de l'assemblage des particules virales puisque son absence résulte en la formation de particules virales aberrantes ayant plusieurs capsides (174, 328). La fonction de relâche virale induite par Vpu se fait dans des compartiments post-RE et requière la présence du domaine N-terminal transmembranaire de la protéine (277, 308). La phosphorylation des résidus sérines en position 52 et 56 de la protéine ne semble affecter que partiellement l'efficacité de relâche induite par Vpu (111). L'augmentation de la relâche virale induite par Vpu ne dépend d'ailleurs pas de la présence de CD4 ou d'enveloppe (329).

Le processus exact selon lequel Vpu augmente la relâche des particules virales est encore méconnu, mais une des explications possibles qui pourrait permettre d'expliquer l'augmentation de la relâche induite par Vpu est que celle-ci pourrait s'assembler de manière à former des canaux ioniques. En premier lieu, il y a une homologie de structure entre Vpu et la protéine M2 du virus de l'influenza, qui est responsable de la formation de canaux ioniques (174, 302). Lors de l'infection par le virus de l'influenza, la formation de canaux ioniques par la protéine M2 permet l'entrée de protons dans les virions et la déstabilisation subséquente de protéines de liaison, induisant ainsi le transport de la nucléocapside au noyau cellulaire. D'autre part, Vpu est en mesure de former des canaux ioniques dans des bicouches lipidiques de façon *in vitro*, mais aussi *in vivo*, lors de l'utilisation d'une protéine Vpu recombinante exprimée dans *E. coli*. De plus, la présence de Vpu permet d'augmenter la conductance de la membrane des oocytes d'amphibiens suite à la formation de canaux ioniques (279). Les canaux ioniques ainsi formés montreraient une spécificité légèrement plus prononcée pour les ions Na^+ que pour les ions Cl^- (96). L'intégrité de la région transmembranaire de Vpu est essentielle à l'induction d'un courant dans les membranes d'oocytes, puisque la randomisation de cette région rend Vpu incapable d'induire ledit courant. D'ailleurs, des études de modélisations ont montré que le domaine transmembranaire de Vpu s'assemble en pentamère, permettant ainsi la formation de canaux ioniques (135). Cependant, le groupe de Coady et collaborateurs croit que l'activité de canal ionique de Vpu dans les membranes d'oocytes serait non-spécifique suite à une insertion inappropriée de Vpu dans les membranes (66). Néanmoins, l'utilisation d'amiloride et de certains dérivés qui bloquent l'activité des canaux Na^+ bloquent aussi l'activité de canal ionique de Vpu et diminuent la relâche de VLP à partir de cellules HeLa, lorsque Gag et Vpu sont co-exprimés (95). Les études du groupe de Stephens ont aussi démontré que la substitution de l'alanine en position 19 du domaine transmembranaire de Vpu par une histidine permettait de

rétablir un motif HxxxTr, reconnu comme étant important dans l'activité de canal ionique chez la protéine M2 du virus de l'influenza. La production d'un virus chimérique SIV-VIH (SHIV) portant cette mutation dans Vpu rend le virus susceptible à la rimantadine, un inhibiteur de l'activité de canal ionique (152). Récemment, un autre groupe a démontré que Vpu interagit avec une protéine cellulaire ayant une activité de canal ionique à ions K^+ sensible aux pH acides, soit TASK-1, dans les cellules 293T, les lymphocytes T $CD4^+$ infectés ainsi que dans les tissus lymphoïdes de patients en phase SIDA (154). Il semblerait que Vpu agit en bloquant la conductance de TASK-1 suite à la formation d'hétéro-oligomères inactifs entre Vpu et TASK-1 et même, en accélérant le rythme normal de dégradation de TASK-1 durant le cours de l'infection au VIH-1. De plus, le domaine transmembranaire retrouvé en N-terminal de TASK-1 possède des homologies avec Vpu et l'expression de ce domaine est suffisante pour rétablir la relâche de virus défectifs pour Vpu (154). Il semble donc que l'augmentation de la relâche virale induite par Vpu puisse être en partie attribuable à l'altération de l'activité de canal ionique de TASK-1. Il est possible de croire que cette altération de la fonction de TASK-1 puisse entraîner différents changements structuraux au niveau de la membrane plasmique, qui permettrait d'augmenter la relâche des particules virales.

Une autre hypothèse est que Vpu augmenterait la relâche virale de manière indirecte suite à une modification du milieu cellulaire environnant. Tout d'abord, il a été montré que Vpu interagit avec une protéine cellulaire UBP (« Vpu-binding protein ») qui, lorsque surexprimée, empêche d'obtenir une relâche efficace en présence de Vpu (51). UBP est aussi capable de se lier au précurseur $Pr55^{Gag}$. La co-expression de Vpu, Gag et UBP entraîne une diminution de la liaison de Gag à UBP (51) en plus d'entraîner une redistribution de ces deux protéines à la membrane plasmique (138). L'une des hypothèses ayant été proposée est que Vpu agirait sur le complexe UBP-Gag en induisant sa dissociation, ce qui permettrait aux molécules Gag leur assemblage en particules virales (51). Une autre étude a montré que la co-expression de Vpu et d'une protéine de fusion entre MA et GFP augmente le ciblage de celle-ci vers les membranes plasmiques (86). Il serait donc possible de croire que Vpu augmente la relâche virale en facilitant le transport de Gag à la membrane plasmique. Toutefois, Vpu est aussi en mesure d'augmenter la relâche virale d'autres rétrovirus, tel le VIH-2, le virus Visna et le virus Mo-MLV (« Moloney murine leukemia virus »), suggérant ainsi que cette fonction ne nécessite pas une interaction spécifique avec le précurseur Gag du VIH-1, mais pourrait plutôt impliquer la modification de certaines voies cellulaires (130).

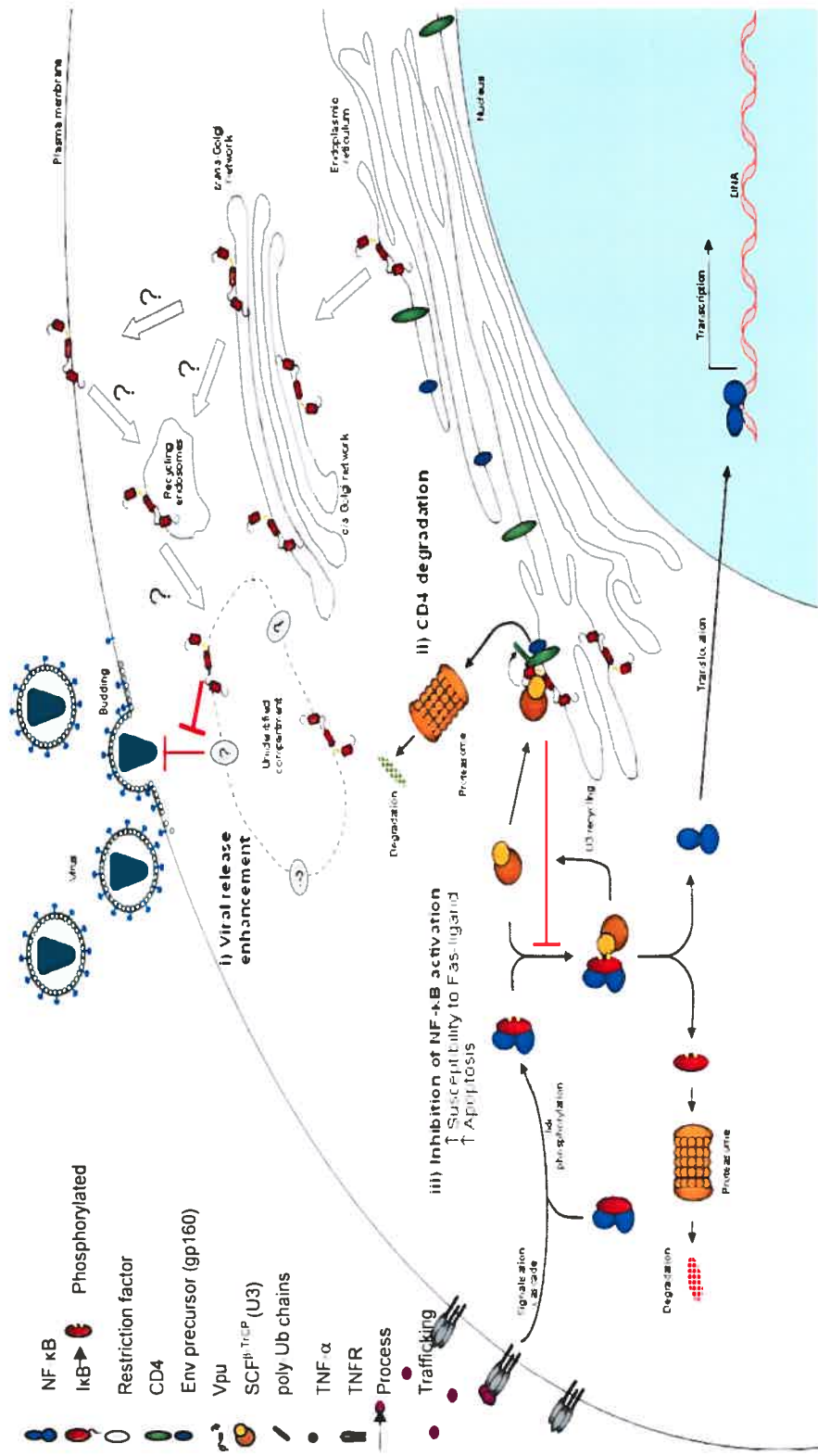


Figure 12 : Schéma récapitulatif des fonctions biologiques de la protéine Vpu du VIH-1. La protéine Vpu est impliquée au niveau de l'augmentation de la relâche virale, au niveau de la dégradation du CD4 néo-synthétisé dans le réticulum endoplasmique et serait aussi impliquée dans l'inhibition de l'activation de NF-κB, ce qui influencerait sur l'apoptose chez les cellules infectées. (Figure gracieusement prêtée par M. Dubé, Unité de Rétrovirologie Humaine de l'IRCM.)

La présence de Vpu pour augmenter l'efficacité de la relâche virale n'est pas requise dans tous les types cellulaires. Une augmentation de la relâche virale en présence de Vpu a pu être observée dans les cellules épithéliales humaines, les lymphocytes T primaires, les lignées de macrophages/monocytes, les PBMCs (« peripheral blood mononuclear cells ») ainsi que certaines lignées utilisées en laboratoire telles les cellules 293T, Jurkat, MT4 et HeLa (85, 122, 130, 272), bien qu'une certaine controverse existe quant à l'efficacité de la relâche induite par Vpu dans les cellules 293T. Cependant, Vpu n'a aucun effet sur la relâche virale dans les cellules simiennes telles que les cellules CV-1, COS-1 et COS-7 (122, 272), la relâche dans ces types cellulaires étant efficace en absence de Vpu. Récemment, l'utilisation d'hétérokaryons formés de cellules humaines-simiennes ou simiennes-simiennes a permis de mettre en évidence l'existence d'un facteur de restriction inhibant la relâche virale du VIH-1 et qui est retrouvé uniquement dans les cellules humaines (314). L'effet de ce facteur de restriction sur la relâche virale serait surmonté par l'action de Vpu (314). Tout dernièrement, ce même groupe a identifié le site des endosomes péricentriolaires de recyclage (« pericentriolar recycling endosome ») comme étant important pour la fonction de relâche de Vpu. En effet, le blocage de la voie de recyclage des endosomes par des mutants dominant-négatif pour la protéine Rab11a et la myosine Vb inhibe l'effet de Vpu sur la relâche virale (315). Toutefois, cette étude n'a pu démontrer avec exactitude quel est le site à partir duquel Vpu induit la relâche virale. De plus, le mécanisme exact par lequel Vpu permet de contrer l'effet du facteur de restriction de même que ledit facteur de restriction reste encore méconnu. Étant donné que Vpu est retrouvé à des sites distincts de ceux de l'assemblage et de la relâche virale, il semble cependant possible que l'effet de Vpu sur la relâche virale soit attribuable à un effet indirect sur la cellule hôte, en contrecarrant par exemple un facteur de restriction. D'ailleurs, une étude récente de Neil et ses collaborateurs suggère fortement que Vpu promouvoit la relâche virale en plus de prévenir l'endocytose des particules virales à la membrane plasmique (231). Ainsi, Vpu empêcherait le transport subséquent des virions au niveau des endosomes précoces et tardifs, tant chez les virions du VIH-1 que chez ceux du virus de la leucémie murine (MLV) (231). Les systèmes qu'ils ont utilisés ont montré qu'une activité spécifique ou un facteur cellulaire présent dans les cellules HeLa, mais absent des cellules HOS, permet de retenir les particules virales matures à la surface des cellules (231). Selon les expériences que ce groupe a présentées, ce facteur serait contrecarré par la présence de Vpu dans les cellules HeLa, permettant ainsi d'augmenter la relâche des virions matures au niveau de la membrane plasmique. Clairement, l'identification d'un facteur de restriction inhibant la relâche virale ciblé par Vpu permettrait d'établir plus précisément un modèle de l'augmentation de la relâche virale par Vpu.

La protéine Vpu n'est pas retrouvée chez le VIH-2. Toutefois, des études ont démontré que pour certains isolats du VIH-2, l'augmentation de la relâche virale serait assurée par le précurseur de la glycoprotéine de l'enveloppe (35, 39). Chez ces isolats, la sous-unité transmembranaire du précurseur de la glycoprotéine de l'enveloppe serait responsable d'assurer l'augmentation de

relâche des particules virales. Il semble donc que cette fonction d'augmentation de la relâche virale soit impliquée dans la propagation virale, puisqu'il s'agit d'une fonction assurée par diverses protéines.

7.2.2 Dégradation du récepteur CD4

L'une des fonctions la plus caractérisée de Vpu est l'induction de la dégradation du récepteur viral, soit le CD4. En effet, Vpu contribue avec Nef et le précurseur de la glycoprotéine de l'enveloppe (gp160) à la régulation négative de la molécule CD4 à la surface de la cellule. Tandis que Nef est responsable tôt dans l'infection de la dégradation du CD4 retrouvé à la surface cellulaire, suite à l'induction de sa réinternalisation et sa dégradation subséquente au niveau des lysosomes, Vpu agit à des stades tardifs de l'infection sur le CD4 néo-synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (323). Effectivement, aux étapes tardives de l'infection, le précurseur de l'enveloppe gp160 retient les molécules de CD4 néo-synthétisées au niveau du RE via sa haute affinité pour ces molécules (voir figure 13 pour un résumé des mécanismes de régulation négative du CD4) (189). La formation de complexes entre la gp160 et CD4 permet la rétention du CD4 au niveau du RE, mais aussi la rétention du précurseur gp160, bloquant par le fait même son transport et sa maturation (76, 158). Brièvement, lorsque Vpu est phosphorylée au niveau des sérines 52 et 56, il y a induction de la dégradation spécifique du CD4, permettant ainsi la libération et la progression du précurseur gp160 vers le Golgi, où il y aura maturation en gp120 et gp41. Ces molécules seront par la suite incorporées dans les particules virales. Pour que Vpu puisse induire la dégradation de CD4, celle-ci se doit d'être retenue au niveau du RE. Durant le cours normal de l'infection par le VIH-1, cette fonction est assurée par la gp160, mais le CD4 peut tout aussi bien être retenu artificiellement en absence d'enveloppe. En effet, lors d'études *in vitro*, il est possible de retenir le CD4 au niveau du RE par la présence de signaux de rétention au RE ou encore, suite au traitement des cellules avec la Brefeldine A (BFA), un métabolite fongique connu pour interférer avec le transport des protéines du RE vers le Golgi (188, 323). Bien que la phosphorylation de Vpu ne soit pas nécessaire à l'interaction avec CD4, elle est importante pour que Vpu puisse induire la dégradation du CD4 au niveau du RE (208, 283). Ainsi, la liaison de Vpu à CD4 est nécessaire mais pas suffisante pour induire la dégradation du CD4. L'induction de la dégradation du CD4 par Vpu est un processus qui implique de multiples étapes, dont la première est l'interaction directe de la partie C-terminale de Vpu avec la queue cytoplasmique de CD4 (208, 277). Effectivement, des études de mutagenèse ont permis d'établir que les résidus 416 à 419, soit le motif EKKT, ainsi que l'hélice α située dans la région proximale du domaine cytoplasmique de CD4 sont nécessaires pour sa liaison à Vpu ainsi que pour sa dégradation subséquente (36, 188, 309, 330). D'autres études, reliant structure et fonctions de Vpu, ont permis de démontrer que la première hélice α du domaine cytoplasmique de Vpu ainsi que l'interface hydrophobe à l'intérieure de cette hélice amphipatique est nécessaire à sa liaison avec CD4 (308).

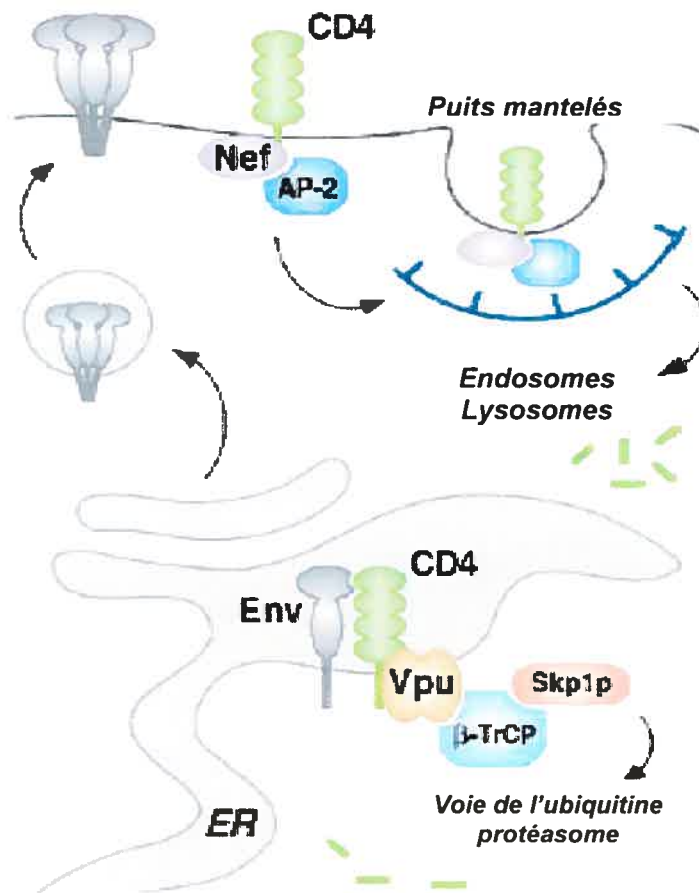


Figure 13 : Mécanismes de régulation négative de l'expression de surface de la molécule CD4 suite à l'infection par le VIH-1. Suite à l'infection par le VIH-1, trois protéines virales ont pour fonction de diminuer l'expression du CD4 à la surface des cellules infectées. La protéine Nef, produite de façon précoce, est nécessaire pour enlever les molécules de CD4 déjà présentes à la surface des cellules en facilitant leur endocytose et leur dégradation subséquente au niveau des lysosomes. Tardivement dans l'infection, la protéine Vpu est impliquée dans la dégradation du CD4 néo-synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique lorsqu'il est retenu par le précurseur de l'enveloppe soit la gp160. Cette dégradation spécifique du CD4 induite par Vpu est effectuée par le système ubiquitine-protéasome. (Figure reproduite de M. Emerman et M.H. Malim. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. 280 : 1881-1884.)

Comme mentionné précédemment, l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu nécessite non seulement une interaction entre ces deux molécules, mais aussi la phosphorylation de Vpu au niveau des ses deux résidus sérines. Effectivement, des études de deux-hybrides ont identifié un facteur cellulaire de la famille des protéines à boîte F (« F-box protein ») impliqué dans l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu (209). Ce facteur cellulaire, nommé β -TrCP, agit comme facteur de reconnaissance pour le complexe ubiquitine ligase E3 SCF ^{β -TrCP}, impliqué dans la voie de conjugaison de l'ubiquitine. Ce complexe est composé de Cul1/Cdc53p, Hrt1p/Roc1/Rbx1 et finalement Skp1 (88). La région C-terminale de β -TrCP comporte des motifs répétés WD et est nécessaire à la liaison à Vpu lorsque celle-ci est phosphorylée, alors que la région retrouvée en N-terminal, via le motif de boîte F, permet le recrutement de Skp1 (209). Le recrutement de Skp1 au niveau du complexe SCF ^{β -TrCP} permet par la suite le recrutement du système de dégradation ubiquitine-protéasome cellulaire, nécessaire à la dégradation du CD4 induite par Vpu (209). Toutefois, Vpu n'est pas dégradée lors de ce processus (182). Également, plusieurs études ont montré que le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans le processus de dégradation du CD4 induit par Vpu. Normalement, l'ubiquitination est un processus cellulaire essentiel au renouvellement des protéines et implique une cascade enzymatique comprenant les enzymes suivantes : les E1 (« ubiquitin-activating enzymes »), les E2 (« ubiquitin-conjugating enzymes ») et les E3 (« ubiquitin-protein ligases ») (150, 321). Effectivement, la modification covalente des protéines à l'aide de chaînes d'ubiquitine constitue un signal permettant la reconnaissance et la destruction des protéines ainsi marquées par le protéasome 26S (287). Brièvement, la E1 active l'ubiquitine de manière ATP-dépendante, permettant par la suite le transfert de l'ubiquitine à la E2. La E2 et la E3 forme un complexe et agit en conjonction pour former une chaîne d'ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine à dégrader. Un seul résidu d'ubiquitine constitue un signal faible pour la dégradation. C'est lorsque la protéine porte une chaîne de poly-ubiquitine que la protéine est reconnue comme étant une cible pour le protéasome 26S et est dégradée par ce dernier (12, 150, 321). Une première étude a montré que Vpu est incapable d'induire la dégradation du CD4 dans des cellules de mammifères exprimant un mutant sensible à la température de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine E1, qui est essentielle à l'attachement des groupements ubiquitine sur la protéine cible. Ensuite, la surexpression d'un mutant de l'ubiquitine (UbK48/R) empêchant la formation des chaînes de polyubiquitine empêche aussi l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu (276). Finalement, la dégradation du CD4 induite par Vpu est sensible à l'utilisation d'inhibiteurs de protéasomes (112, 276).

Vpu, de par sa capacité à lier et séquestrer β -TrCP au niveau du cytoplasme, est responsable de l'inhibition de la dégradation normale, par le système ubiquitine-protéasome, de plusieurs de ses substrats (10, 27, 33). En effet, Vpu empêche la dégradation de I κ B α induite suite à l'induction de voies de signalisations par TNF α , résultant ainsi en l'apoptose des cellules infectées. De

plus, Vpu bloque aussi la dégradation de la β -caténine et induit une augmentation de son activité transcriptionnelle et l'accumulation de substrats de β -TrCP (27). D'autre part, Vpu est connue pour inhiber l'activité de NF κ B (10), contribuant aussi à l'augmentation de l'apoptose des cellules infectées, puisque l'activation de NF κ B entraîne normalement l'expression de gènes ayant des propriétés anti-apoptotiques (10, 60, 241). Le groupe de Akari et ses collaborateurs a effectivement montré que Vpu induit la régulation négative de gènes anti-apoptotique dont l'expression est dépendante de l'augmentation de NF- κ B, tel que Bcl-xL et A1/Bfl-1 (10). Cette même étude a aussi montré que l'expression de Vpu dans les cellules augmente le taux de caspase-3 active, une protéine qui est impliquée dans la régulation de l'apoptose. De plus, ils ont aussi montré que les effets de Vpu sur l'augmentation de l'apoptose nécessite une interaction directe avec β -TrCP, suggérant ainsi que Vpu fonctionnerait comme un inhibiteur compétitif de β -TrCP (10). Ainsi, il en résulterait une accumulation progressive de I κ B et l'inhibition subséquente et graduelle de NF- κ B, ce qui empêcherait alors la synthèse des protéines anti-apoptotiques, menant ultimement à l'induction de l'apoptose des cellules (10).

Malgré le fait que de nombreuses études portent sur la fonction de dégradation du récepteur viral par Vpu, de nombreux aspects du mécanisme restent encore à découvrir. En effet, il y a incertitude quant à la nécessité et/ou au moment de la dislocation du CD4 du RE vers le cytoplasme dans le processus de dégradation induit par Vpu, dans les cellules humaines. En effet, des études ont montré que chez la levure *S. cerevisiae*, CD4 était ubiquitiné *in trans* par le complexe SCF ^{β -TrCP} suite à l'expression de Vpu (218). D'ailleurs, dans les cellules HeLa, les résidus lysines cytosoliques sont nécessaires à la dégradation du CD4 induite par Vpu, laissant croire que l'accès à ces résidus pourrait être une étape précoce du processus de dégradation du CD4 par Vpu et pourrait aussi précéder une étape de dislocation du CD4 du RE vers le cytoplasme (276). Le modèle de la dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu est illustré à la figure 14.

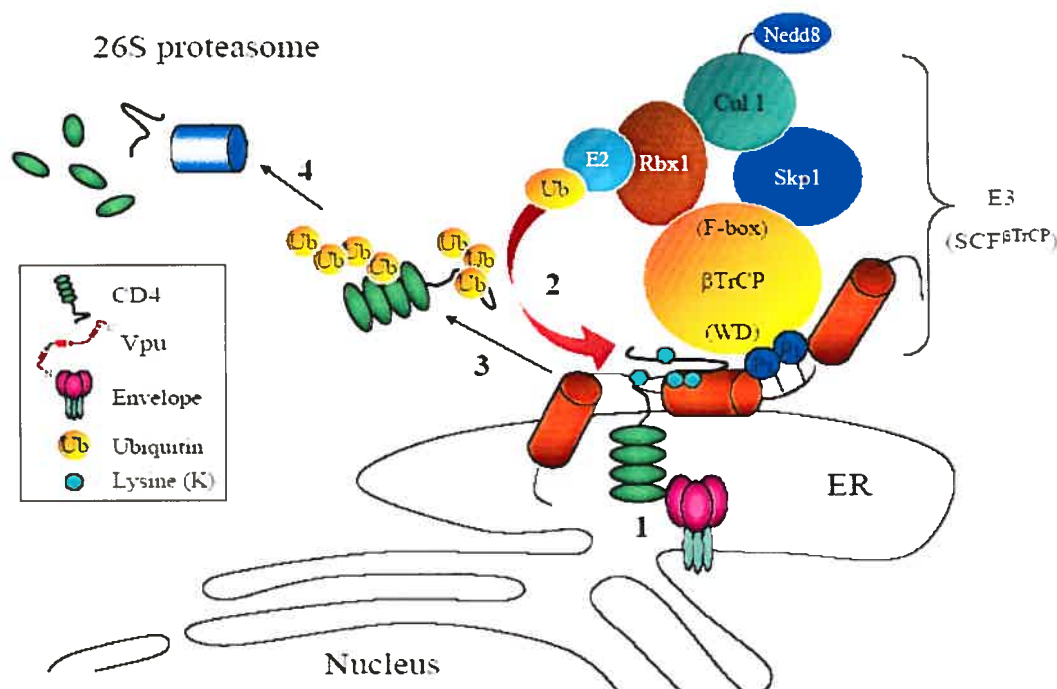


Figure 14 : Modèle de la dégradation de la molécule CD4 induite par la protéine Vpu du VIH-1. Le précurseur de l'enveloppe virale, la gp160, interagit et retient les molécules de CD4 néo-synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. Le domaine cytoplasmique de Vpu interagit avec le domaine cytoplasmique de la molécule CD4. La protéine Vpu recrute une protéine cellulaire, β -TrCP, faisant partie du complexe ubiquitine ligase (E3). Cette liaison nécessite la phosphorylation des sérines en position 52 et 56 de Vpu. Suite à cette interaction, il y a recrutement de Skp1 ainsi que des autres composantes du complexe E3 SCF β -TrCP. Il y aurait ensuite polyubiquitination de CD4 par le complexe E3 lié à Vpu. Suite à la polyubiquitination du CD4, il est possible que le CD4 puisse être rétrotransloqué dans le cytoplasme où se produirait sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome 26S. (Binette, J. et Cohen, E.A. 2004. Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. Dec;4(4):297-307.)

8. Importance de la régulation négative du CD4 durant l'infection par le VIH-1

Étant donné que la régulation négative du récepteur CD4 à la surface des cellules infectées est assurée par différentes protéines virales, il est possible de croire que cette régulation est importante pour la réplication et la pathogenèse virale du VIH-1. De multiples études ont montré que la diminution de l'expression de CD4 à la surface cellulaire induite par Vpu et/ou Nef vont contribuer à la propagation virale (34, 73, 181, 269). Tout d'abord, lors de l'infection de singes avec des souches de SIV portant des mutations qui empêchent d'induire la régulation négative du CD4 induite par Nef, il y a une diminution importante de la virémie (157). D'ailleurs, l'analyse de variants de Nef provenant de patients LTNPs montre une diminution de leur habileté à la régulation négative du récepteur CD4 (311), alors que l'analyse de variants de Nef retrouvés à des stades tardifs de l'infection montre clairement une augmentation de cette capacité (57). Une autre étude a démontré que des virus portant des variants de Nef retrouvés à des stades tardifs et ayant des capacités accrues de régulation négative du récepteur CD4 montraient aussi une augmentation de la réplication et de l'infectivité virale (17). Ensuite, des études utilisant un virus SHIV portant des mutations au niveau de séquences importantes pour la régulation négative du CD4 par Vpu menaient soit à une diminution de la pathogénicité chez les singes infectés ou encore, à une réversion de la séquence mutée pour une séquence de type sauvage (292). L'importance de la régulation négative du CD4 par les différentes protéines du VIH-1 concernant l'infectivité des particules virales a aussi été soulignée par de nombreuses études (17, 73, 181, 190, 198, 269, 305). En premier lieu, certains ont constaté une diminution de la relâche virale lors de la surexpression de CD4 dans des cellules 293T (269), alors que d'autres ont pu démontrer qu'une forte expression de CD4 au niveau des cellules infectées menait à une diminution de l'infectivité des particules virales relâchées (181). De plus, cette dernière étude a démontré que les particules virales produites en absence de Nef et/ou Vpu étaient aussi moins infectieuses. Leurs résultats montraient effectivement que les particules virales ainsi produites incorporent moins de glycoprotéines d'enveloppe et plus de CD4. Également, des études menées dans notre laboratoire ont montré que l'accumulation de CD4 à la surface des cellules infectées menait à l'incorporation desdites molécules de CD4 et permettait ainsi la formation de complexes entre la sous-unité de surface de la glycoprotéine de l'enveloppe gp120 et le CD4, à la surface même des virions (190). Ainsi, la formation de ces complexes à la surface des virions entraînerait une diminution du niveau d'enveloppe disponible pour l'entrée subséquente de ces particules virales dans une nouvelle cellule, les sites de liaison à CD4 étant déjà saturés. La figure 15 montre divers modèles proposés pour expliquer la diminution de l'infectivité des particules virales induite par le CD4. Une autre hypothèse pouvant expliquer la diminution de l'infectivité des particules virales en présence de hauts niveaux de CD4 est le modèle de l'agrégation des virions, selon lequel les virions seraient retenus à la surface cellulaire via une interaction entre le CD4 et la gp120. Enfin, le modèle de

la séquestration de l'enveloppe suggère que le haut taux de CD4 permettrait de séquestrer les protéines de l'enveloppe au niveau de domaines de non-bourgeonnement, empêchant ainsi la relâche des particules virales. Bien que d'autres études soient nécessaires pour réellement comprendre l'ensemble des implications de la régulation négative du récepteur CD4 par les protéines virales, les études présentées jusqu'à maintenant tendent à démontrer que cette fonction joue un rôle important dans la pathogenèse virale. D'ailleurs, une étude récente du groupe de Wildum et ses collaborateurs a montré que la régulation négative du CD4 par les protéines Nef, Env et Vpu permet d'empêcher la surinfection des cellules infectées par le VIH-1, bien que la plus grande implication de Nef dans ce processus ait été soulignée (322). Ainsi, en empêchant qu'il ait surinfection des cellules, le virus s'assure qu'une production virale importante soit accomplie avant la mort desdites cellules (322).

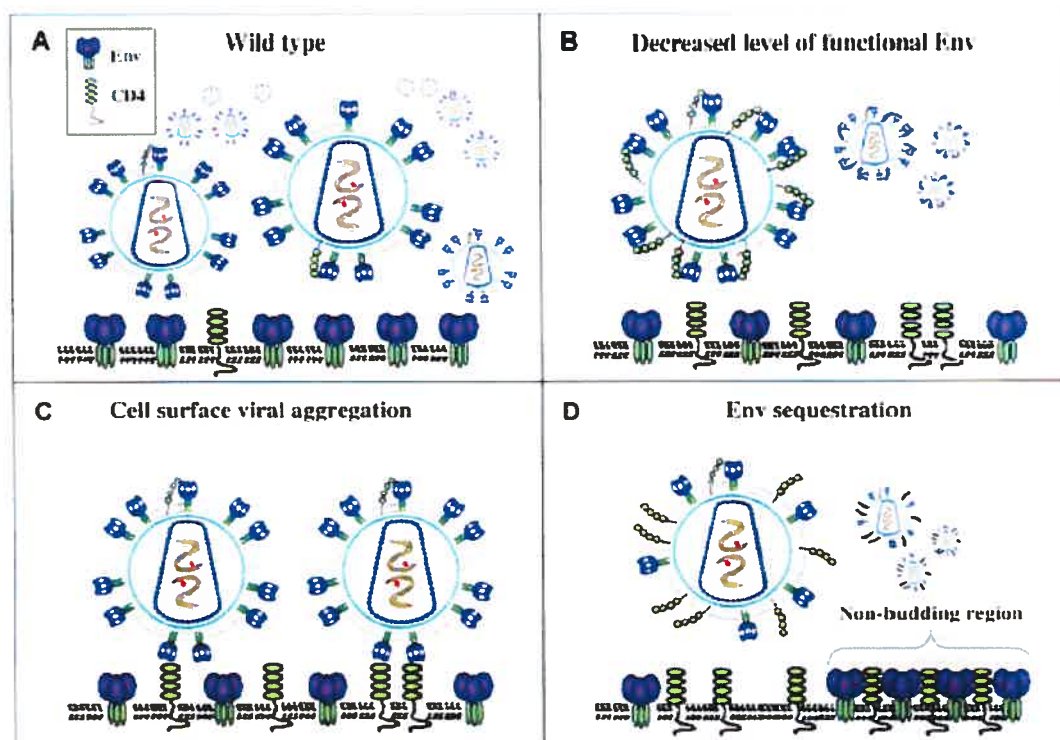


Figure 15 : Différents modèles proposés pour expliquer l'inhibition de l'infektivité des particules virales du VIH-1 induite par le CD4. A) Lors de l'infection par le VIH-1, Nef et Vpu contribuent à la diminution drastique de l'expression de CD4 à la surface des cellules infectées ainsi que son incorporation au niveau des particules virales, permettant la relâche de particules virales totalement infectieuses. B) En absence de Nef et/ou de Vpu, les molécules de CD4 sont incorporées dans les particules virales dû à une forte expression à la surface de la cellule infectée, résultant ainsi en une diminution de l'infektivité desdites particules suite à la formation de complexes CD4/gp120 à la surface des virions. C) Le modèle de l'agrégation propose qu'une haute expression de CD4 à la surface de la cellule empêche la relâche des particules virales en retenant les virions à la surface de la cellule. D) En absence de Nef et/ou Vpu, le haut niveau d'expression de CD4 à la surface des cellules infectées entraîne une diminution de l'infektivité virale suite à la séquestration de l'enveloppe virale par CD4 au niveau de domaines de non-bourgeonnement de la membrane plasmique. CD4 est aussi incorporé dans les particules virales, bloquant l'incorporation efficace de l'enveloppe dans les virions au stade de bourgeonnement. (Figure reproduite de Lévesques, K., Finzi, A. et Binette, J. 2004. Role of receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* 2 ; 51-59)

Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Le VIH-1 infecte principalement des cellules exprimant le récepteur CD4 à leur surface (78, 173). Cependant, le virus code pour trois protéines différentes, soit Nef, Env et Vpu, ayant pour fonction principale ou secondaire de réguler négativement l'expression du CD4 à la surface des cellules une fois que celles-ci sont infectées. Cette convergence de fonction suggère fortement que la régulation négative du récepteur viral, suite à l'infection, confère un avantage sélectif au virus de manière *in vivo*. Il semble en effet selon certains groupes, que l'expression de CD4 à la surface des cellules infectées cause une diminution de la relâche des particules virales (34, 269). Le groupe de Lama et ses collaborateurs a clairement démontré que de hauts niveaux de CD4 à la surface des cellules infectées entraînaient une diminution importante du potentiel infectieux des particules virales relâchées (181). D'ailleurs, des études biochimiques des particules virales produites en absence de Nef et/ou Vpu ont montré que l'expression de CD4 dans les cellules infectées entraînait une diminution de l'efficacité d'incorporation des protéines d'enveloppes dans les virions, tout en permettant l'incorporation du CD4 dans les particules virales (190). Ces résultats ont récemment été appuyés par les études de Cortes *et al.* qui ont montré que l'expression de CD4 à des niveaux physiologiques, dans des cellules Jurkat, entraîne une diminution de l'infectivité des particules virales ainsi produites (73). De plus, des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que la protéine Vpu du VIH-1 a un effet positif sur l'infectivité des particules virales suite à la régulation négative du CD4 à la surface des cellules infectées (190). Ces mêmes études ont montré que l'incorporation de CD4 dans les particules virales entraînait un phénomène d'interférence viral en diminuant l'infectivité des particules virales ainsi produites. Ainsi, l'accumulation de CD4 dans les particules virales permet la formation de complexes entre le CD4 et la gp120, diminuant alors le niveau d'enveloppe disponible pour l'entrée subséquente des virions dans les cellules. Ces études mettent en évidence l'importance de la régulation négative du CD4 à la surface des cellules infectées pour la relâche des particules virales, mais aussi pour l'obtention de particules virales totalement infectieuses. La protéine Vpu du VIH-1 contribue de manière importante à la régulation négative du CD4 en induisant la dégradation du CD4 néo-synthétisées au niveau du RE, via le recrutement du système ubiquitine-protéasome cellulaire (209, 276, 323). Pour être en mesure d'induire la dégradation du CD4, Vpu se doit d'être phosphorylée au niveau des sérines retrouvées en position 52 et 56, ce qui permet le recrutement du facteur cellulaire β -TrCP et par la suite, le recrutement de la machinerie cellulaire de dégradation protéique ubiquitine-protéasome dépendante (209). Toutefois, aucune étude à ce jour n'a montré si les protéines Vpu provenant des différents sous-types du VIH-1 sont en mesure de réguler négativement plus ou moins efficacement le CD4 à la surface cellulaire que les isolats du sous-type B ou même, si ces protéines Vpu sont en mesure d'utiliser d'autres voies de dégradation du CD4. Pourtant, il est connu que Vpu est une protéine polymorphique. Des études préliminaires effectuées au laboratoire semblent indiquer que certains isolats primaires ont une plus faible capacité à induire

la dégradation du CD4 par Vpu, malgré que leur capacité à lier CD4 et β -TrCP ne semble pas altérée. Étant que Vpu est tout de même exprimée chez ces isolats primaires, il semble possible que celle-ci ait tout de même un rôle important lors de l'infection au VIH-1 par ces isolats. L'hypothèse de ce projet de recherche est qu'il est possible que la protéine Vpu du VIH-1 soit en mesure de réguler négativement le CD4 à la surface cellulaire de deux façons différentes, soit via l'induction de la dégradation et/ou par un phénomène de rétention, afin de permettre la formation de particules virales totalement infectieuses. Il serait donc possible que des mutations compensatoires puissent se produire chez certains variants de Vpu afin de compenser une fonction de dégradation du CD4 inefficace et ce, en augmentant l'affinité et/ou l'avidité de Vpu pour CD4 et/ou en augmentant la stabilité de Vpu en soi. Ainsi, ces variants de Vpu seraient en mesure de retenir le CD4 de manière intracellulaire plutôt que d'induire sa dégradation.

Ce projet de recherche visait à tester l'hypothèse que certains isolats primaires du VIH-1 aient la capacité de séquestrer ou de retenir le CD4 de façon intracellulaire afin de compenser pour un défaut au niveau de la dégradation du CD4 et, par le fait même, permettre la formation de particules virales totalement infectieuses.

La première partie de mes travaux portent sur la caractérisation de l'activité de dégradation du CD4 de plusieurs variants de Vpu et permettra de documenter la cause des défauts de dégradation du CD4 par les variants défectifs. De manière plus spécifique, ce projet de recherche devrait permettre de démontrer et quantifier la diminution de la dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu provenant de certains isolats primaires. De plus, en utilisant des cellules 293T transfectées à l'aide d'expressions de Vpu provenant d'isolats primaires, nous voulons démontrer que ce défaut au niveau de la capacité de dégradation du CD4 par ces variants n'est pas imputable à une perte de liaison à CD4 et/ou à β -TrCP.

Dans une seconde partie, nous voulons déterminer et quantifier les autres mécanismes de régulation négative du CD4 induits par Vpu, soit la rétention intracellulaire du CD4 et l'augmentation de la stabilité de Vpu dans le temps. Dans cette seconde partie, nous avons pour objectif spécifique de démontrer, à l'aide du marquage du CD4 total et en surface analysé par FACS, que 1) la régulation négative du CD4 par certains variants de Vpu provenant d'isolats primaires est causée par la rétention de la molécule CD4 de manière intracellulaire et 2) vérifier la stabilité de certains variants de Vpu à la suite de marquage métabolique.

La dernière partie de mes travaux visait à démontrer l'effet des processus permettant la régulation négative du CD4, induite par ces variants, sur l'infectivité virale. Spécifiquement, en co-transfectant un provirus Vpu⁻ avec des constructions exprimant Vpu provenant d'isolats primaires en *trans* en présence et en absence de CD4 (variants ayant la capacité de retenir le

CD4 de façon intracellulaire), nous voulions vérifier si les particules virales ainsi produites avaient un plein potentiel infectieux. Finalement, l'analyse des particules virales ainsi que des cellules nécessaires à la formation des virions nous a permis de mesurer le degré d'incorporation de CD4 au niveau des particules virales.

Matériel et méthodes

1. Plasmides et vecteurs d'expression

1.1 Clones moléculaires du VIH-1

Les constructions provirales codant pour un gène *vpu* fonctionnel, soit HxBH10-Vpu⁺, et son homologue non fonctionnel, HxBH10-Vpu⁻, ont été décrites précédemment (308). Brièvement, les nucléotides des positions 5787 à 6347 (fragment Sall-KpnI) du clone moléculaire SVC21 ont été remplacés par le fragment Sall-KpnI du provirus BH10. Pour ce qui est de la construction HxBH10-Vpu⁻, celle-ci a été obtenue suite au remplacement du codon d'initiation ATG (position 5420) par un codon CTG, ayant pour but d'éviter l'expression de la protéine. Ces constructions ont le génotype suivant : 5'-LTR-*gag*⁻, *pol*⁻, *vif*⁻, *vpr*⁺, *tat*⁻, *rev*⁻, *vpu*⁻, *env*⁻, *nef*⁻, -LTR3'.

1.2 Expresseurs de Vpu

Le vecteur d'expression codant pour le gène *vpu* provenant du clone moléculaire BH10 a été cloné suite à la création d'un site XbaI dans HxBH10-Vpu⁺ à la position 5405 à 5410 en amont de l'ATG de Vpu (amorce 5' Vpu BH10 XbaI : 5'-AAG CAG TCT AGA GTA CAT GTA ATG CAA CCT-3') et en utilisant le site KpnI retrouvé naturellement après le gène *vpu* à la position 5702 à 5707 (amorce 3' Vpu BH10 KpnI : 5'-TTC CAC ACA GGT ACC CCA TAA-3'), comme il a été décrit précédemment (329). Le fragment clivé XbaI-KpnI a ensuite été inséré dans le vecteur SVCMV-Vpr⁺ dans lequel un site KpnI a été créé avant le site SacI de *vpr* (amorce 3' Vpr 80A-B : 5'-ATG AGC TCG GTA CCG ATC TAC TGG CTC-3'). La linéarisation du vecteur SVCMV-Vpr⁺ suite au clivage XbaI-KpnI permet le remplacement du gène *vpr* par le fragment XbaI-KpnI codant pour le gène *vpu* provenant de HxBH10-Vpu⁺. Une stratégie identique a été utilisée afin de cloner un expresseur SVCMV codant pour un gène *vpu* non fonctionnel à partir de HxBH10-Vpu⁻. En ce qui concerne le clonage du gène *vpu* provenant d'isolats primaires, des amorces permettant la création d'un site XbaI et KpnI ont aussi été utilisées, mais en utilisant une séquence conservée des isolats pour le site KpnI (5'-CAC ACA GGT ACC CCA TAA-3'), alors que l'amorce 5' Vpu BH10 XbaI a été utilisée pour éviter d'avoir des différences au niveau des séquences se trouvant avant l'ATG de Vpu. Ceci permet de s'assurer que des différences au niveau de l'expression des divers gènes *vpu* provenant d'isolats primaires ne sont pas dues à ses séquences. Le fragment XbaI-KpnI amplifié à partir des provirus complets ou de fragments de provirus provenant du NIH Reagent Program a été inséré dans le vecteur SVCM-Vpr⁺ clivé XbaI-KpnI.

1.3 Expresseurs de CD4

Le vecteur d'expression SVCMV-CD4 a été décrit précédemment (327). Brièvement, le fragment codant pour CD4 a été inséré XbaI-SmaI dans le vecteur SVCMVexpa, qui contient un site de clonage multiple de type SP64 (Promega) bordé par un promoteur du cytomegalovirus (CMV) en 5' ainsi qu'un signal poly(A) provenant du virus simien 40 (SV40) et un intron de l'antigène petit T à l'extrémité 3'.

Le vecteur d'expression pHIV-CD4 a été décrit précédemment (323). Brièvement, un fragment de restriction EcoRI de 3,0 kb provenant du plasmide T4-pMV7 (201) et contenant la totalité du gène codant pour la molécule CD4 humaine a été inséré entre les sites BssHI (nucléotide 711) et XhoI (nucléotide 8887) du clone moléculaire pNL4.3 du VIH-1(7). L'avantage de ce plasmide est qu'il est sous le contrôle des LTR et nécessite donc la présence de Tat pour être exprimé. Il s'agit donc d'un système conditionnel dans lequel CD4 ne sera exprimé que dans les cellules co-transfectées avec un clone proviral du VIH-1.

Le vecteur SVCMV-CD4-T4-LTR a été obtenu suite au clonage du fragment complet T4 (1,8kb) dérivé du plasmide pSL3-T4hyg dans le vecteur SVCMV-T4sol suite au remplacement du fragment T4sol, digéré BamHI, par le fragment complet T4 contenant la séquence codant pour le CD4 humain.

1.4 Autres vecteurs d'expression

Le vecteur d'expression pCDNA3- β -TrCP a été obtenu du Dr Benarous et a été décrit précédemment (209). Brièvement, l'ADNc codant pour la protéine β -TrCP humaine a été amplifiée par un PCR en deux étapes (Nested-PCR) à partir d'une librairie de plasmides. Le fragment de 1,4kb obtenu a été sous-cloné dans le plasmide pGAD-VBP1 en un fragment 5'-SpeI- 3'-BglII. Le fragment a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pCDNA3 de manière appropriée.

2. Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire 293T provenant de fibroblastes de rein humain transformés par l'antigène grand T du virus SV40 ainsi que par la protéine E1a de l'adénovirus de type 5 (91, 133) a été cultivée dans du milieu Dulbecco Eagle modifié (DMEM) (Wisent Inc.) additionné de 1% en antibiotiques (P/S : pénicilline et streptomycine ; Wisent Inc.) et de 5 ou 10% de sérum de veau foetal (SVF ; Wisent Inc.) décomplémenté.

Les cellules HeLa-CD4-LTR- β -gal (170) ont été obtenues du NIH Research and Reference Program et ont été utilisées pour les essais d'infektivité. Il s'agit de cellules épithéliales provenant d'un carcinome cervical humain (31, 163) à l'intérieur desquelles une copie intégrée du gène codant pour la β -galactosidase se retrouve sous le contrôle du LTR du VIH-1. De plus,

cette lignée cellulaire exprime le gène CD4. Elles ont été cultivées de la même façon que la lignée 293T. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à une température de 37°C dans une atmosphère humidifiée de 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

Les transfections ont été effectuées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium tel que décrite précédemment (63).

3. Isolement de l'ADN de PBMCs et Nested-PCR

Des cellules mononucléées de sang périphériques (PBMCs), obtenues par le biais de la Cohorte St-Luc des utilisateurs de drogues injectables, provenant de donneurs infectés par le VIH-1 ont été isolées sur gradient de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec), tel que recommandé dans le guide du fabricant. Ces cellules ont ensuite été utilisées pour en extraire l'ADN génomique (ADNg). Pour ce faire, l'ensemble Qiaamp DNA minikit (Qiagen) a été utilisé selon le protocole du fabricant. L'ADNg ainsi récupéré, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en deux temps pour l'amplification spécifique du gène *vpu* provenant de l'isolat primaire portant le nom LFWV a été effectuée (Figure 16). Un premier PCR utilisant des amorces externes soit l'une avant *vif* (pré-vif 5' : CGG GTT TAT TAC AGG GAC AGA position 4157 de BH10) et l'autre après *vpu* (aft-Vpu 3' : GGC ATG TGT CCC AAA CAT TAT G position 5775 de BH10) permet d'amplifier un fragment de 1618 pb à partir de l'ADNg. Le produit PCR ainsi obtenu sert de matrice pour la seconde amplification à l'aide d'amorces dites internes qui ciblent directement *vpu* et créent de part et d'autre dudit gène un site XbaI (5' Vpu XbaI clinic : 5'-TCA AAG CAG TCT AGA GTA CAT GTA-3') et un site KpnI (3' Vpu KpnI clinic : 5'-AAG GTG TGT CCA TGG GGT ATT-3'), donnant un fragment final de 302 pb. La réaction de PCR utilisée contenait 3,0 mM de MgSO₄, 400 mM de chacun des dNTPs, 10X de tampon KOD (Novagen), 10X de solution *enhancer* (Invitrogen), 2,5U de KOD Hot Start Polymerase (Novagen), 2 mM d'amorces externe pré-vif 5' ou interne 5' Vpu XbaI clinic, 2 mM d'amorces externes aft-vpu 3' ou 3' Vpu KpnI clinic et complété à 50 µl avec de l'eau bidistillée. Le profil d'amplification utilisé pour l'amplification est le suivant : initiation à 94°C pour une durée de 5 minutes (min) suivi de 40 cycles à 15 secondes (sec) à 94°C, à 55,5°C pour 30 sec, et à 68°C pour une durée de 1 min. Une étape d'extension finale a été effectuée à 68°C pour une durée de 5 min.

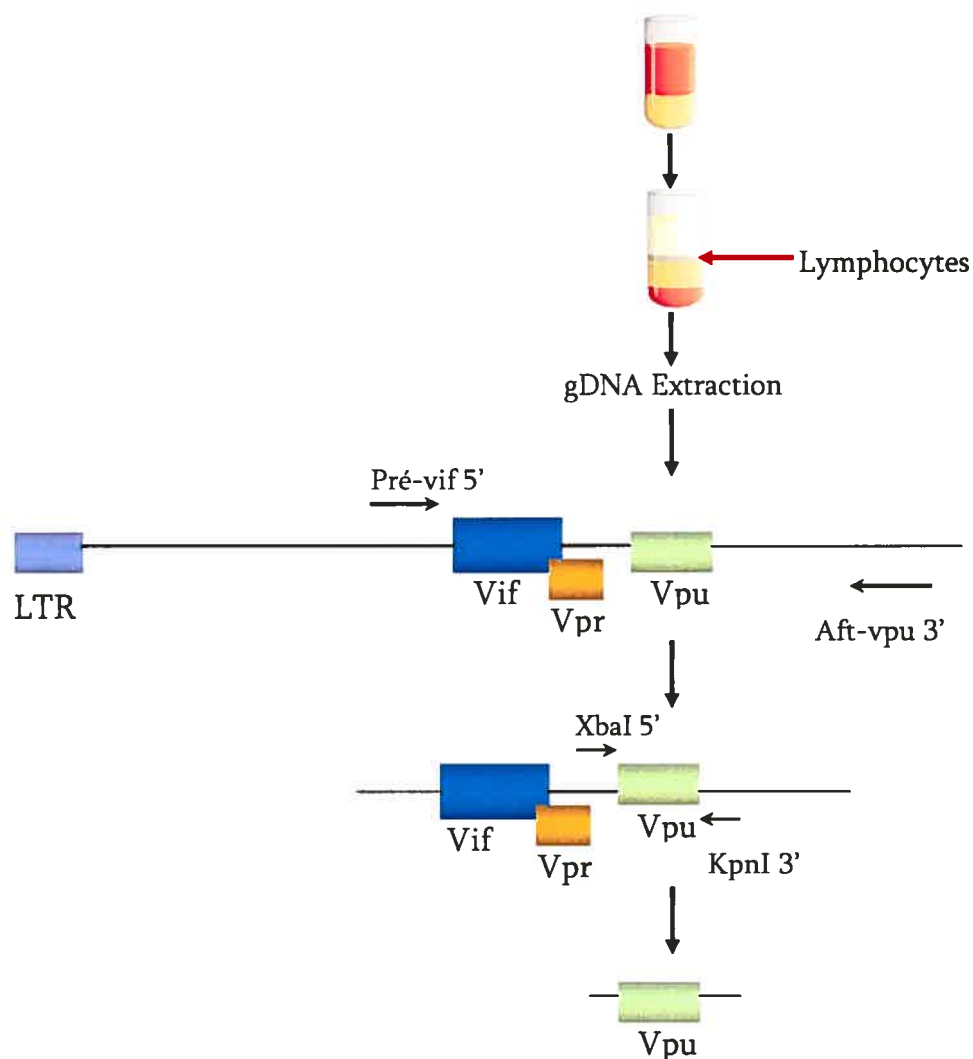


Figure 16 : Schématisation de l'approche utilisée pour l'amplification du gène Vpu à partir de l'ADNg extrait de PBMCs provenant de patients infectés par le VIH-1.

4. Analyses par cytométrie en flux

4.1 Marquage de surface

48 heures post-transfection, 500 000 cellules 293T ont été lavées deux fois à l'aide de solution saline (PBS) et récoltées dans du PBS contenant 5% de SVF décomplémenté (PBS-sérum). Par la suite, les cellules ont été incubées une heure à 4°C dans du PBS-sérum contenant l'anticorps (Ac) primaire monoclonal OKT4 dirigé contre CD4 (dilution 1:250). Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois au PBS afin d'éliminer l'Ac non lié, puis les cellules ont été traitées, à 4°C pour une durée d'une heure, avec du PBS-sérum contenant l'Ac secondaire, soit un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de souris couplé à Alexa Fluor® 488 (dilution 1:250 ;

Molecular Probes). Les cellules ont alors été lavées quatre fois au PBS, puis analysées par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur® cytometer (BD Biosciences). Des cellules transfectées seulement avec le vecteur d'expression SVCMV-Vpu⁻ ont été utilisées comme témoin négatif.

4.2 Marquage total

48 heures post-transfection, 1 million de cellules 293T ont été lavées deux fois au PBS, puis incubées 20 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA) afin de fixer les cellules. Les cellules ont ensuite été lavées une fois au PBS, puis incubées dans du NH₄Cl (50 mM) pour une durée de 15 min, afin de diminuer l'auto-fluorescence. Par la suite, les cellules ont été lavées une fois au PBS et incubées une heure dans une solution de PBS-BSA-saponine (0,05% Saponine, 1,0% BSA) contenant l'anticorps primaire monoclonal OKT4 dirigé contre CD4 (dilution 1:250). Quatre lavages au PBS ont ensuite été effectués, puis les cellules ont été incubées une heure dans du PBS-BSA-saponine contenant l'Ac secondaire de chèvre dirigé contre les anticorps de souris couplé à Alexa Fluor® 488 (dilution 1:250 ; Molecular Probes). Quatre lavages au PBS ont été effectués, puis les cellules ont été analysées par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur® cytometer (BD Biosciences). Toutes les incubations susmentionnées ont été effectuées à la température de la pièce. Comme témoin négatif, des cellules transfectées seulement avec le vecteur d'expression SVCMV-Vpu⁻ ont été utilisées.

5. Analyses protéiques

5.1 Anticorps

Afin de révéler la protéine Vpu par immunobuvardage (Western Blot), l'anticorps 4H₁₀LC-KLH a été utilisé. Cet anticorps polyclonal couplé à un peptide non immunogène (KLH : *keyhole limpet haemocyanin*) est dirigé contre la portion C-terminale de Vpu (HHAPWDIDDL) et a été obtenu suite à l'injection d'un lapin avec ledit peptide (70). Un second anticorps polyclonal de lapin produit de la même façon que le précédent a été utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation de Vpu. Cependant, plutôt que d'être couplé au peptide KLH, celui-ci a été couplé à l'albumine sérique de bovin (BSA) et porte alors le nom de 4H₁₀LC-BSA. L'anticorps polyclonal anti-Vpu nommé R21S a été obtenu suite à l'injection d'un lapin avec un peptide correspondant en partie au dodécapeptide non phosphorylé de Vpu (RKIDRLIDRLIERAEDSGNES). Cet anticorps permet donc de reconnaître uniquement les formes non-phosphorylées de la protéine.

L'anticorps monoclonal anti-CD4 (OKT4) et anti-myc (9E10) a été obtenu à partir des fluides d'ascites suite à l'injection de souris Balb/c avec l'hybridome OKT4 (American Type Culture Collection, catalog #ATCC CRL-8002. Rockville, MD) ou avec l'hybridome 9E10

respectivement. L'anticorps polyclonal de lapin anti-CD4 H-370 provient de Santa Cruz Biotechnology (catalog #sc-7219). Ces anticorps ont été utilisés respectivement pour les immunoprécipitations de CD4 ainsi que pour la détection de CD4 par immunobuvardage. L'anticorps de lapin anti-actine a été obtenu de chez Sigma Chemical Co (catalog #A-2066). Les anticorps utilisés pour l'analyse des particules virales sont les suivants : en premier lieu, l'anticorps monoclonal dirigé contre la p24 a été obtenu à partir de fluides ascitiques de souris Balb/c qui ont été injectées avec les hybridomes p24 (American Type Culture Collection, catalog #ATCC HB9725, Manassas, VA) (190). L'anticorps monoclonal de souris anti-gp120 (1D6) a été obtenu grâce au AIDS research and reference reagent program (89). Finalement, le sérum anti-VIH-1 (#162) a été obtenu d'un patient infecté qui a été testé positif par ELISA pour la présence d'anticorps contre le VIH-1.

L'anticorps polyclonal de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 a été acheté chez Molecular Probes. Les anticorps polyclonaux de mouton anti-souris et d'âne anti-lapin, couplés à l'enzyme HRP (*horseradish peroxidase*), proviennent de chez Amersham Biosciences.

5.2 Marquages et immunoprécipitations

5.2.1 Tests d'expression/stabilisation de Vpu

1,2 X 10⁶ cellules 293T ont été étalées en pétri puis, 24 heures plus tard, transfectées avec les constructions SVCMV-Vpu codant pour le gène *vpu* provenant d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été récoltées puis cultivées 30 minutes à 37°C dans un milieu DMEM dépourvu de méthionine et de cystéine (MP Biomedical), additionné de 10% de SVF dialysé et dans lequel a été ajouté ou non de la Brefeldine A (Sigma) à une concentration finale de 10 µM (milieu de carence). Les cellules ont ensuite été lavées puis resuspendues dans le milieu de carence auquel a été ajouté un mélange d'éléments radioactifs contenant de la [³⁵S]méthionine et de la [³⁵S]cystéine ([³⁵S] Protein Labeling Mix, Perkin Elmer) (800 µCi/ml) pour une durée de deux heures. Les cellules sont ensuite lysées dans 800 µl de RIPA (140 mM de NaCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 2 mM de NaH₂PO₄, 1% de Nonidet P-40, 0,05% de SDS, 0,5% sodium deoxycholate [DOC]) auquel a été ajouté un cocktail d'inhibiteur de protéases Complete™ (Roche). Les lysats cellulaires ont été soumis à une étape de pré-nettoyage où 3 µl d'anti-sérum de lapin normal et 30 µl de protéine-A-agarose sont ajoutés aux lysats pour une période de une heure à 4°C. La protéine Vpu est ensuite immunoprécipitée soit avec 10 µl d'anticorps 4H₁₀LC-BSA, soit avec 15 µl d'anticorps R21S pour une période de deux heures. Les complexes immuns ont été immunoprécipités en utilisant des billes de protéine A-sépharose (Amersham Biosciences), lavés deux fois avec du RIPA sans DOC et une fois avec du Tris-NaCl pH 7,2 (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl), pour finalement être resuspendus dans du tampon réducteur contenant du SDS, bouillis et séparés sur un gel de

12,5% de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines Vpu ont ensuite été révélées par autoradiographie et les bandes ont été quantifiées à l'aide d'un densitomètre AFGA Duoscan T1200. L'analyse densitométrique a été effectuée à l'aide de Image Quant 5,0 (Molecular Dynamics).

5.2.2 Tests de dégradation du CD4 par Vpu

Pour chacun des échantillons, quatre pétris contenant $1,2 \times 10^6$ cellules 293T ont été co-transfectées avec les vecteurs d'expression codant pour le gène *vpu* provenant d'isolats de laboratoires ou d'isolats primaires et avec le vecteur d'expression SVCMV-CD4. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été récoltées et incubées 30 minutes dans un milieu de carence (voir ci-haut) ne contenant ni méthionine, ni cystéine et dans lequel a été ajouté de la BFA (10 μ M). Les cellules ont ensuite été lavées puis incubées 30 minutes à 37°C dans le milieu de carence auquel a été ajouté un mélange d'éléments radioactifs contenant de la [³⁵S]méthionine et de la [³⁵S]cystéine ([³⁵S] Protein Labeling Mix, Perkin Elmer) (800 μ Ci/ml), puis une étape de chasse dans du DMEM complet avec BFA (10 μ M) a suivi. Aux temps indiqués, soit 0, ½, 2 et 5 heures, les cellules ont été recueillies et lysées dans du RIPA-DOC avec inhibiteurs de protéases Complete™ (Roche). Comme mentionné précédemment, une étape de lavage du lysat a été effectuée, suivi d'une première immunoprécipitation de deux heures avec l'anti-CD4 (OKT4). Les complexes immuns ont été immunoprécipités avec des billes de protéine A-sépharose et le surnageant a été transféré afin d'immunoprécipiter Vpu avec 15 μ l de sérum anti-Vpu R21S (2 heures, 4°C). Les complexes immuns ont alors été immunoprécipités comme précédemment et lavés deux fois au RIPA sans DOC et une fois au Tris-NaCl pH 7,2. Les échantillons ont été resuspendus dans un tampon réducteur contenant du SDS, bouillis, et séparés sur un gel 12,5% de SDS-PAGE. Les protéines ont été révélées par autoradiographie et les bandes quantifiées à l'aide d'un densitomètre AFGA Duoscan T1200. L'analyse densitométrique a été effectuée à l'aide de Image Quant 5,0 (Molecular Dynamics).

5.2.3 Tests de liaison à CD4 et à β -TrCP

24 heures avant la co-transfection avec les vecteurs d'expression codant pour le gène *vpu* provenant soit d'isolats de laboratoire, soit d'isolats primaires avec l'expresseur de CD4 SVCMV-CD4 ou avec l'expresseur de β -TrCP pCDNA3- β -TrCP, $1,2 \times 10^6$ cellules 293T ont été étalées sur pétri. Dans les 48 heures après la transfection, les cellules ont été placées dans un milieu de carence contenant ou non de la BFA (10 μ M) durant deux heures ou trente minutes, selon que le test soit destiné à évaluer la liaison à CD4 ou à β -TrCP, respectivement. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées durant deux heures dans un milieu de carence auquel a été ajouté un mélange d'éléments radioactifs contenant de la [³⁵S]méthionine et de la [³⁵S]cystéine ([³⁵S] Protein Labeling Mix, Perkin Elmer) (800 μ Ci/ml) supplémenté ou non avec 10 μ M de BFA. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon doux, soit du CHAPS à pH 7,2

(50 mM Tris, 5mM EDTA, 100mM NaCl) et immunoprécipitées en premier lieu avec 4µl d'un anticorps anti-CD4 (OKT4) ou d'anti-myc, puis subséquemment avec un sérum anti-Vpu à raison de 8 µl pour l'anticorps 4H₁₀LC-BSA ou 15 µl pour l'anticorps R21S, selon les expériences. Les complexes immuns ont été immunoprécipités en présence de billes de protéine A-sépharose, lavés trois fois au Tris-NaCl pH 7,2, resuspendus dans un tampon réducteur contenant du SDS, bouillis et séparés sur gel 12,5% de SDS-PAGE. La présence des complexes a été révélée par autoradiographie et quantifié comme mentionné précédemment.

6. Production virale

Les virus HxBH10-Vpu^{+/+} complémenté en *trans* avec les vecteurs d'expressions codant pour les gènes *vpu* provenant de mutants ou d'isolats primaires, en présence et en absence de CD4, ont été produits suite à la transfection de deux millions de cellules 293T avec 10 µg des constructions provirales, 4 à 10 µg d'expresseurs SVCMV-Vpu (mutant ou isolats primaires), 2 µg du vecteur pHIV-CD4 ou 2 µg de SVCMV-CAT comme contrôle et ce, par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules sont culotées et les virus retrouvés dans le surnageant ont été récoltés.

6.1 Coussin de sucrose

Les virus retrouvés dans les surnageants à 48 heures post-transfection sont clarifiés suite à une centrifugation à 3000 rpm pour une durée de 15 minutes. Par la suite, les virus sont concentrés par ultracentrifugation à 45 000 rpm, sur un coussin de sucrose 20%, durant une heure trente minutes à 4°C (rotor de type 70Ti, Beckman Instruments, Mississauga, ON).

6.2 Essai de transcriptase inverse

La production virale a été déterminée par mesure de l'activité de la transcriptase inverse (essai standard RT) dans une réaction de 50µl de surnageant viral clarifié. À ces surnageants sont ajoutés 50 µl de mélange réactionnel contenant 50 mM de Tris (pH 7,9), 5 mM de MgCl₂, 150 mM de KCl, 0,5 mM de EGTA, 0,05% de Triton X-100, 2% d'éthylène glycol, 5 mM de dithiothréol (DTT), 3 mM de glutathione réduit (GSH), 50 µg/ml de poly(rA)-Oligo(dT) et 20 µCi de [³H]-dTTP. Le mélange est ensuite incubé à 33°C pour une période d'au moins 22 heures, puis les acides nucléiques sont précipités suite à l'ajout de 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) 10% froid, durant deux heures à 4°C. L'ADN double brin radiomarké à l'aide de la thymidine tritiée est alors récupéré sur des filtres qui seront alors rincés deux fois à l'aide de TCA 5%, puis une fois avec de l'éthanol 100%. Les filtres ont alors été déposés dans des vials contenant du liquide à scintillation, puis la radioactivité incorporée est mesurée grâce à un compteur Beta (1215 Rackbeta Liquid scintillation counter, LKB Wallac).

6.3 Essais d'infectivité (MAGI)

Des quantités équivalentes de virus, tel que normalisé par l'essai RT (40 000cpm de RT), ont été utilisées afin d'infecter les cellules HeLa-CD4- β -gal passées la veille dans une plaque de 24 puits, à raison de 20 000 cellules par puit. Dans les 48 heures suivant l'infection, les cellules sont lavées au PBS, fixées avec une solution de glutaraldéhyde puis colorées au X-Gal tel que décrit précédemment (170). Le nombre de cellules infectées est déterminé suite au comptage des cellules bleues par microscopie photonique.

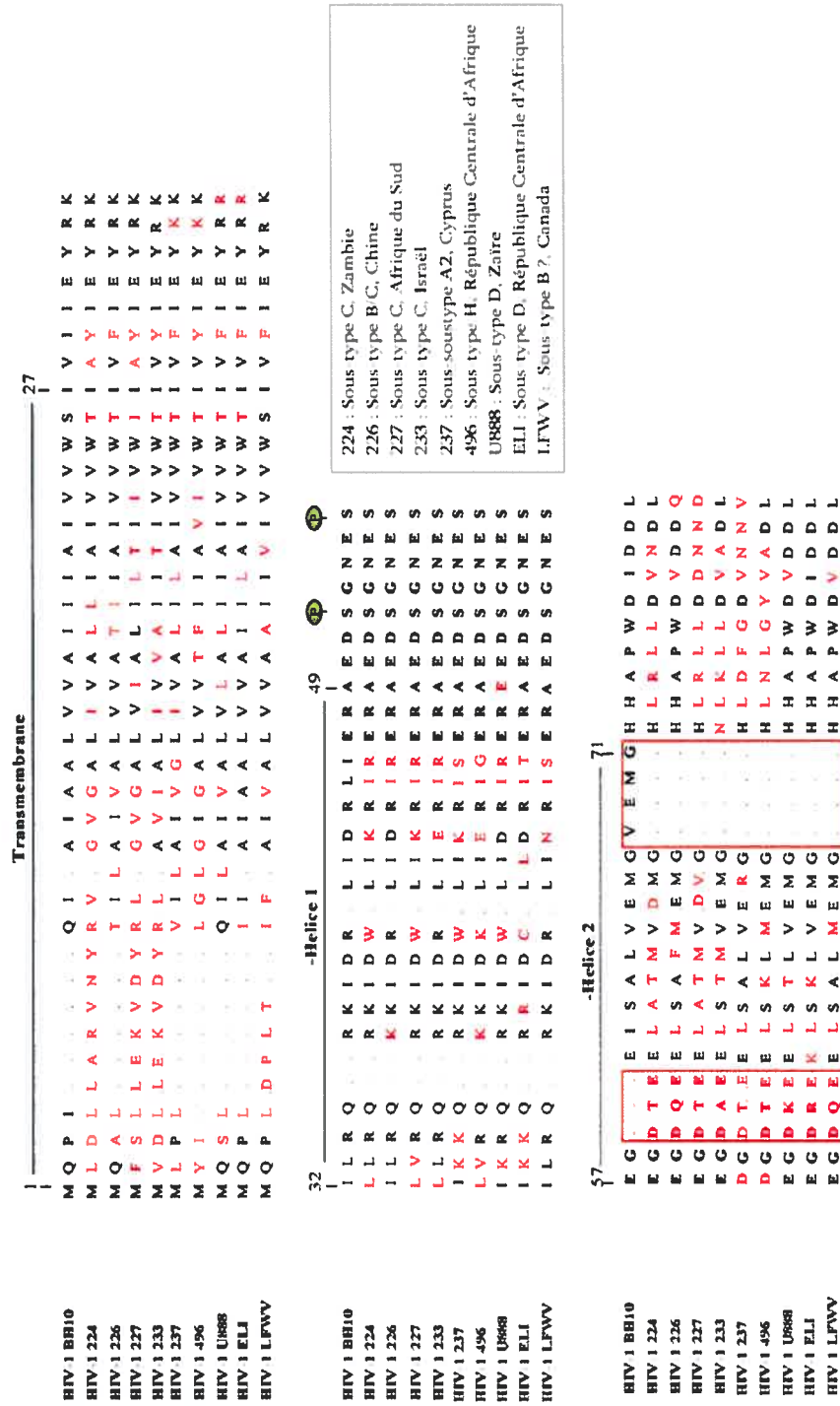
6.4 Immunobuvardage (Western Blot)

Pour effectuer l'analyse des particules virales ainsi que des cellules 293T ayant servies à leur production, la technique d'immunobuvardage a été utilisée. Premièrement, une quantité similaire de virions, tel qu'évalué par activité de transcriptase inverse (RT), a été lysée directement dans un tampon réducteur contenant du SDS. Les protéines virales ont été séparées sur gel 10% SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de nitrocellulose (pores de 0,45 μ m ; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) par électrotransfert durant une période de 16 heures à 250 mA dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 193 mM Glycine, 20% méthanol). Par la suite, les membranes récupérées ont été incubées pour une durée de 30 minutes à la température de la pièce dans un tampon TBST (20mM Tris, 137mM NaCl, 0,1% Tween®20 [MP Biomedicals Inc] contenant 5% de lait. Les membranes ont ensuite été lavées cinq fois au TBST pour des périodes de 10 minutes suivi par une incubation de deux heures soit avec un anticorps polyclonal dirigé contre CD4 (dilution 1:200), soit avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la p24 (dilution 1:3000) ou la gp120 (dilution 1:5). Suivant cette incubation, 5 lavages additionnels au TBST ont été effectués, puis les anticorps liés ont été sondés durant 45 minutes en utilisant des anticorps anti-souris ou anti-lapin lié au HRP, selon le cas (dilution 1:7500 et 1:7000 respectivement). Les membranes ont ensuite été lavées durant cinq périodes de 10 minutes et la détection a été effectuée par la méthode sensible de détection par chemiluminescence (ECL detection kit ; Amersham Biosciences). En ce qui concerne l'analyse des cellules productrices de virus, celles-ci ont été lysées dans 800 μ l de RIPA-DOC contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete™ (Roche). Ensuite, les lysats ont été mis sur gel 12,5% SDS-PAGE et le transfert des protéines sur membranes de nitrocellulose et leurs traitements successifs ont été effectués comme mentionné ci-haut. De plus, la détection de l'actine dans les cellules productrices de virions a été effectuée à l'aide de l'anticorps polyclonal (Sigma Chemical Co) de lapin dirigé contre l'actine (dilution 1:1200).

Résultats

La protéine Vpu provenant de certains isolats primaires est détectée à différents niveaux

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer que nous détectons la même quantité de protéines Vpu pour chacun des isolats, de manière à pouvoir les comparer entre eux. Nous avons donc procédé à des expériences de marquage métabolique de la protéine Vpu de divers isolats primaires. Étant donné que la séquence de Vpu provenant de l'isolat de laboratoire BH10 ne possède pas le motif DxE normalement retrouvé chez les isolats primaires (position 59 à 63) et qu'il possède en surplus une séquence VEMG, un mutant de Vpu a été généré de manière à ce que la séquence soit identique à celle de BH10, sauf en ce qui a trait à l'ajout d'un motif DTE et en la suppression de la répétition de la séquence VEMG (voir figure 17). Ainsi, ce mutant a une séquence similaire à un isolat primaire du groupe M du VIH-1. Tout d'abord, des cellules 293T exprimant de façon transitoire la protéine Vpu provenant d'isolats de laboratoire bien caractérisés ou provenant d'isolats primaires ont été utilisées. Par la suite, les cellules 293T ont été transfectées de la même manière, mais avec une quantité d'ADN normalisée pour l'obtention d'un équivalent de Vpu détecté comparable à SVCMV-Vpu DTEΔVEMG. Les cellules ont été récoltées 48 heures suivant la transfection, et soumises à une étape de carence en présence de Brefeldine A afin de retenir les protéines au niveau de RE, puis marquées au ^{35}S -translabel. En effectuant ces expériences en présence de BFA, nous voulions nous assurer qu'une même quantité de protéine Vpu était produite au niveau du RE pour chacun des échantillons, de manière à pouvoir ultérieurement les comparer entre eux en ce qui concerne leurs capacités fonctionnelles. D'autre part, le marquage des protéines au ^{35}S -translabel a l'avantage d'être d'une grande sensibilité lors de la détection des protéines et permet d'être plus quantitatif que si un immunobuvardage avait été effectué directement sur le lysat cellulaire. La protéine Vpu a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires avec soit un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de Vpu (4H₁₀LC) ou un anticorps dirigé en partie contre le dodécapeptide conservé de Vpu (R21S), dans le but de déterminer la quantité de protéines détectées avec chacun des anticorps. Étant donné que la portion C-terminale des différents isolats primaires utilisés lors de cette étude est peu conservée (voir figure 17), l'utilisation de l'anticorps R21S, ciblant une région plus conservée, allait permettre de quantifier plus justement le niveau de Vpu dans les cellules. Cependant, cet anticorps permet seulement la reconnaissance des formes de Vpu non-phosphorylées. Des données obtenues précédemment au laboratoire suggèrent que 50% des protéines Vpu sont retrouvées sous une forme non-phosphorylée. La figure 18A (gauche) démontre que lorsqu'une même quantité d'ADN de chacune des constructions est transfectée, la quantité de Vpu détectée avec l'anticorps anti-Vpu 4H₁₀LC n'est pas tout à fait la même pour chacun des échantillons et que cet anticorps ne permet pas la détection de l'échantillon 496. Lorsque Vpu provenant des mêmes échantillons est plutôt

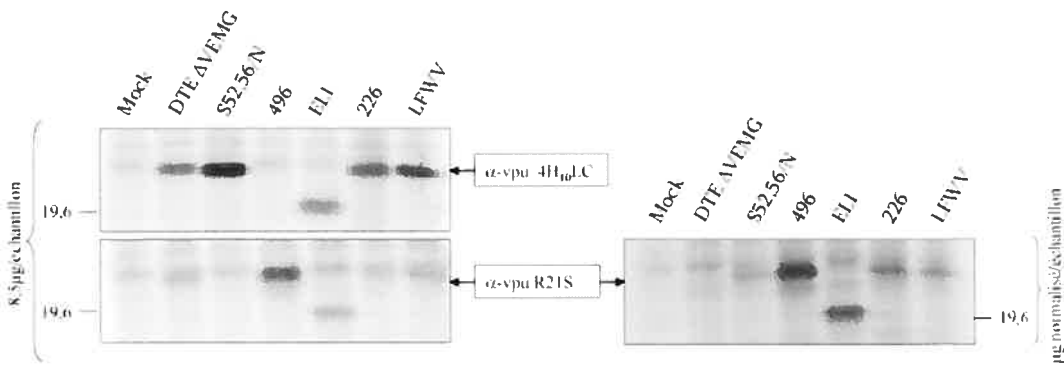


immunoprécipitée avec l'anticorps anti-Vpu R21S, l'échantillon primaire 496 est correctement détecté, mais à des niveaux plus élevés que pour les autres échantillons (résultats représentatifs de deux expériences indépendantes). Une analyse quantitative par densitométrie (18B et 18D) a permis d'établir que lorsqu'une même quantité d'ADN est transfectée, il y a légèrement plus de protéines Vpu détectées pour les échantillons ELI et LFWV (0,4 fois plus pour ELI et 0,11 fois plus pour LFWV) comparé à l'échantillon de laboratoire Vpu-DTEΔVEMG, alors que l'échantillon 226 est détecté à 50% du niveau retrouvé pour l'échantillon Vpu-DTEΔVEMG. En ce qui concerne l'échantillon primaire 496, il y a 1,33 fois plus de protéine Vpu détectée pour cet échantillon que pour l'échantillon de laboratoire Vpu-DTEΔVEMG, à quantité égale d'ADN transfectée. Le mutant S52,56/N n'est pas détecté par l'anticorps anti-Vpu R21S dû aux mutations des résidus sérines en position 52 et 56. Cette analyse quantitative a permis de calculer les quantités nécessaires à l'obtention d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de l'isolat de laboratoire Vpu-DTEΔVEMG. C'est ce qu'on retrouve à la figure 18A (à droite), soit la détection des protéines Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et primaires lorsqu'une quantité d'ADN normalisée est transfectée dans des cellules 293T. Ainsi, l'analyse quantitative par densitométrie des bandes retrouvées sur l'autoradiogramme de droite (figure 18C et 18E) démontre que certaines différences persistent. En effet, malgré la transfection d'une quantité normalisée d'ADN pour obtenir une même quantité de protéines détectées au niveau du RE avec l'anticorps anti-Vpu R21S, par rapport à l'isolat de laboratoire Vpu-DTEΔVEMG, les isolats primaires sont tout de même exprimés plus fortement. Ces différences peuvent être attribuables à l'état des cellules lors de la transfection ou encore à la qualité de l'ADN utilisée. Effectivement, certaines observations faites dans notre laboratoire montraient que l'expression de Vpu pouvait être variable selon le fait que les cellules aient été transfectées suite à de multiples passages en culture cellulaire ou non. De plus, la confluence des cellules au moment de la transfection semble aussi avoir une influence au niveau de l'expression de Vpu, malgré qu'un nombre équivalent de cellules aient été transfecté. On ne peut aussi exclure que certains isolats primaires ont un plus grand ratio de protéines Vpu retrouvées sous une forme non-phosphorylées. Ainsi, les protéines Vpu provenant des isolats ELI, 496, 226 et LFWV sont détectées à de plus hauts niveaux que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire Vpu-DTEΔVEMG (environ 4,5 fois plus pour ELI et 496 et 2 fois plus pour 226 et LFWV). À partir des données obtenues suite à cette expérience, une nouvelle quantification a permis d'évaluer la quantité d'ADN à transfecter pour obtenir une quantité de protéine Vpu détectée similaire entre les divers isolats (figure 18C). Ces quantités d'ADN seront utilisées ultérieurement pour diverses expériences.

Figure 18 : Les protéines Vpu provenant de divers isolats primaires sont détectées à différents niveaux dans les cellules 293T.

- A. Des cellules 293T ont été transfectées avec 8,5 µg d'ADN (expresseurs SVCMV-Vpu isolats de laboratoire (IL) ou isolats primaires (IP)) ou avec une quantité équivalente à la détection de 8,5µg de SVCMV-Vpu DTEΔVEMG. 48 heures post-transfection, les cellules ont été soumises à un marquage métabolique au ^{35}S -translabel. Les cellules ont été lysées et Vpu a été immunoprécipitée soit à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de Vpu (4H₁₀LC), soit contre la portion conservée du dodécapeptide (R21S). Les protéines radiomarquées ont été séparées sur gel SDS-PAGE et révélées par autoradiographie. Figure représentative de deux expériences indépendantes.
- B. Tableau I : Analyse quantitative par densitométrie des bandes obtenues pour la protéine Vpu avec l'anticorps R21S et pourcentage d'expression relatif de divers isolats primaires par rapport au contrôle positif (Vpu DTEΔVEMG) lorsqu'une même quantité d'ADN est transfectée pour tous les échantillons, ainsi que la quantité d'ADN à transfecter pour obtenir une détection équivalente avec l'anti-Vpu R21S. nd : non-déterminé.
- C. Tableau II : Analyse quantitative par densitométrie des bandes obtenues pour la protéine Vpu avec l'anticorps R21S et pourcentage d'expression relatif de divers isolats primaires par rapport au contrôle positif (Vpu DTEΔVEMG) lorsqu'une quantité normalisée d'ADN est transfectée pour chacun des échantillons par rapport à Vpu DTEΔVEMG, ainsi que la quantité d'ADN à transfecter pour obtenir une détection équivalente avec l'anti-Vpu R21S.
- D. Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage d'expression relatif à Vpu DTEΔVEMG pour chacun des échantillons. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant à la protéine Vpu sur l'autoradiogramme retrouvé à la figure 18A (en bas, à gauche) a été mesurée. Le pourcentage d'expression relatif à Vpu DTEΔVEMG a ensuite été calculé en divisant la quantité de Vpu pour chacun des isolats primaires par la quantité de Vpu DTEΔVEMG et ce, lorsqu'une même quantité d'ADN (8,5µg) a été transfectée pour tous les échantillons.
- E. Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage d'expression relatif à Vpu DTEΔVEMG pour chacun des échantillons. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant à la protéine Vpu sur l'autoradiogramme retrouvé à la figure 18A (en bas, à droite) a été mesurée. Le pourcentage d'expression relatif à Vpu DTEΔVEMG a ensuite été calculé en divisant la quantité de Vpu pour chacun des isolats primaires par la quantité de Vpu DTEΔVEMG et ce, lorsqu'une quantité normalisée d'ADN a été transfectée pour chacun des échantillons pour obtenir un équivalent de détection similaire à Vpu DTEΔVEMG.

A.



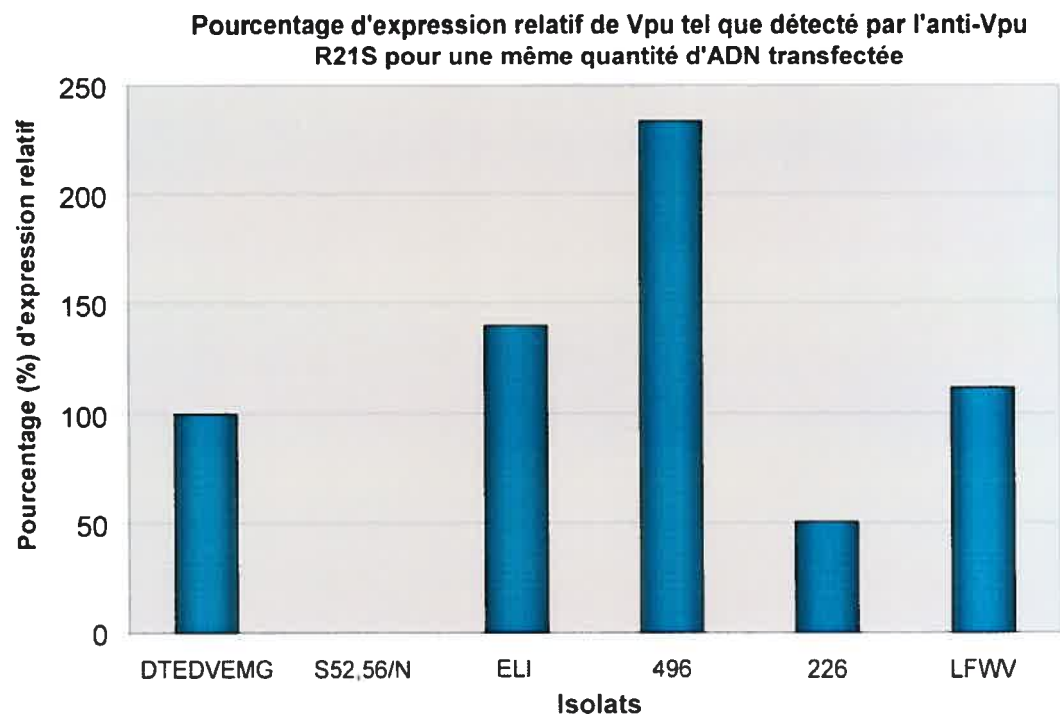
B.

	Volume	Pourcentage (%)	Equivalent pour 8,5µg
Isolats	α-Vpu R21S	d'expression relatif	de DTEΔVEMG (ul)
DTEΔVEMG	4004911	100.00	8.5
S52.56/N	nd	nd	nd
ELI	5601747	139.87	6.08
496	9354004	233.56	3.64
226	2020932	50.46	16.84
LFWV	4468442	111.57	7.62

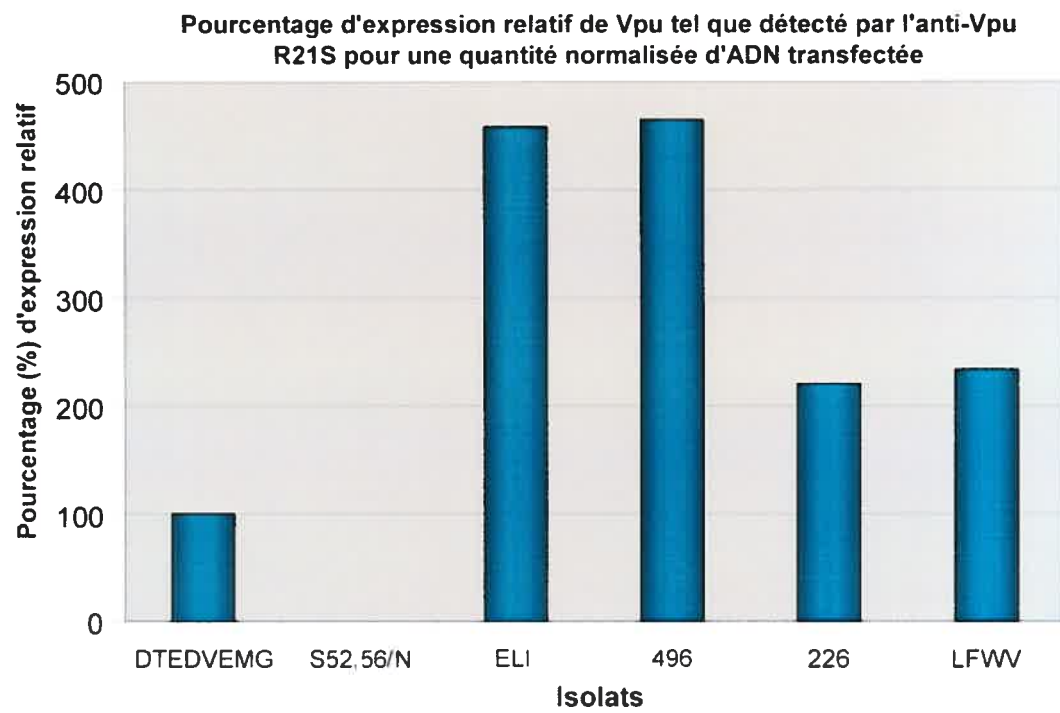
C.

	Volume	Pourcentage (%)	Equivalent pour 8,5µg
Isolats	α-Vpu R21S	d'expression relatif	de DTEΔVEMG (ul)
DTEΔVEMG	3173432	100.00	8.5
S52.56/N	nd	nd	nd
ELI	14530941	457.89	1.86
496	14746553	464.68	1.83
226	6976087	219.83	3.87
LFWV	7402975	233.28	3.64

D.



E.



La protéine Vpu provenant de certains isolats primaires est incapable de dégrader efficacement le CD4, malgré une liaison efficace à CD4 et à β -TrCP

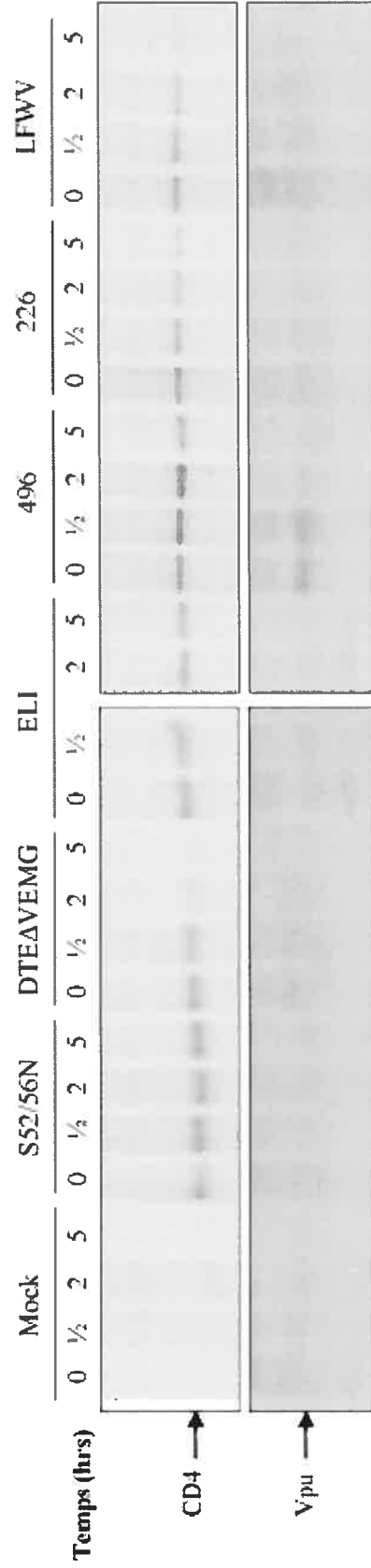
Les tests d'expression de Vpu nous ont permis d'évaluer la quantité d'ADN à transfecter afin d'obtenir un niveau de détection similaire de la protéine Vpu provenant de différents isolats de laboratoire ou primaires. Il est connu que l'une des fonctions principales de Vpu est d'induire la dégradation de la molécule CD4 nouvellement synthétisée au niveau du RE (276). Des résultats préliminaires de notre laboratoire démontrent que certains isolats primaires avaient une capacité diminuée à induire la dégradation de CD4. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier ces résultats dans notre système, soit dans les cellules 293T, lorsqu'une quantité normalisée d'ADN est transfectée. De plus, nous avons utilisé l'anticorps anti-Vpu R21S, qui permet la détection des formes non-phosphorylées de Vpu en reconnaissant une région bien conservée de la protéine chez les différents isolats primaires étudiés. Ainsi, des expériences de marquage métabolique des protéines CD4 et Vpu ont été effectuées et les cinétiques de dégradation de la protéine CD4 dans le temps ont été évaluées. Des cellules 293T ont donc été co-transfectées avec des quantités normalisées d'ADN de vecteurs d'expressions (SVCMV) codant pour les protéines Vpu provenant soit d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires et avec une quantité constante d'un expresseur de CD4 (SVCMV-CD4). Les cellules ont été récoltées après 48 heures et soumises à une étape de carence en présence de Brefeldine A, qui permet ici de retenir artificiellement le CD4 au niveau du RE, simulant ainsi la rétention du CD4 au RE normalement effectuée par la gp160. Les cellules ont ensuite été marquées au ^{35}S -translabel. À différents temps, les cellules ont été lysées et les protéines CD4 et Vpu ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires. La figure 19A démontre qu'en présence d'une protéine Vpu connue pour être fonctionnelle pour sa capacité à induire la dégradation de CD4, soit DTE Δ VEMG, le CD4 présent dans les cellules au temps 0 est rapidement dégradé en présence de Vpu. Cependant, lorsqu'une protéine Vpu défective pour cette même fonction, soit S52,56/N, est co-transfectée avec un expresseur de CD4, la quantité de CD4 retrouvée dans les cellules demeure relativement constante dans le temps. Ces deux contrôles nous permettent d'évaluer si les isolats primaires étudiés seront définis comme étant fonctionnels ou défectifs pour la fonction de dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu. Ainsi, cette même figure nous permet de constater que la protéine Vpu provenant des isolats primaires 226 et LFWV est en mesure d'induire correctement la dégradation du CD4 dans le temps, alors que les isolats ELI et 496 ne semblent pas en mesure d'induire une dégradation efficace du CD4 dans le temps. Une analyse quantitative par densitométrie nous a permis d'établir une courbe de la cinétique de dégradation du CD4 en présence de Vpu pour les divers isolats utilisés (figure 19B). Cette courbe démontre clairement que la cinétique de dégradation du CD4 induite par Vpu pour les isolats ELI et 496 est tout à fait similaire à la courbe de l'isolat S52,56/N, soit un isolat incapable d'induire la dégradation du CD4 dû à son incapacité à recruter β -TrCP. Cette

Figure 19 : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont une plus faible capacité de dégradation de la molécule CD4.

- A.** Des cellules 293T ont été transfectées ou non avec des vecteurs d'expression codant pour la protéine Vpu provenant d'isolats de laboratoire (Vpu DTEΔVEMG, S52,56/N) ou d'isolats primaires (Vpu ELI, 496, 226, LFWV), avec des quantités d'ADN normalisées par rapport à Vpu DTEΔVEMG. Dans les 48 heures suivant la transfection, un marquage métabolique au ³⁵S-translabel a été effectué en présence de Brefeldine A et aux temps indiqués (0, ½, 2 et 5 heures), les cellules ont été lysées et la protéine CD4 a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD4, soit l'OKT4. La protéine Vpu a ensuite été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion non-phosphorylée du dodécapeptide de Vpu (anti-Vpu R21S). Les protéines ainsi marquées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie. Figure représentative de deux expériences indépendantes.
- B.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage de CD4 restant relativement au temps 0 pour chacun des isolats utilisés. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant au CD4 pour chacun des échantillons recueillis aux temps indiqués a été mesurée à partir de l'autoradiogramme. Le pourcentage de CD4 restant relativement au temps 0 a été calculé en divisant la quantité de CD4 mesurée aux différents temps par la quantité de CD4 mesurée au temps 0. Les barres d'erreurs sur le graphique représentent l'écart type calculé à partir de deux expériences indépendantes.

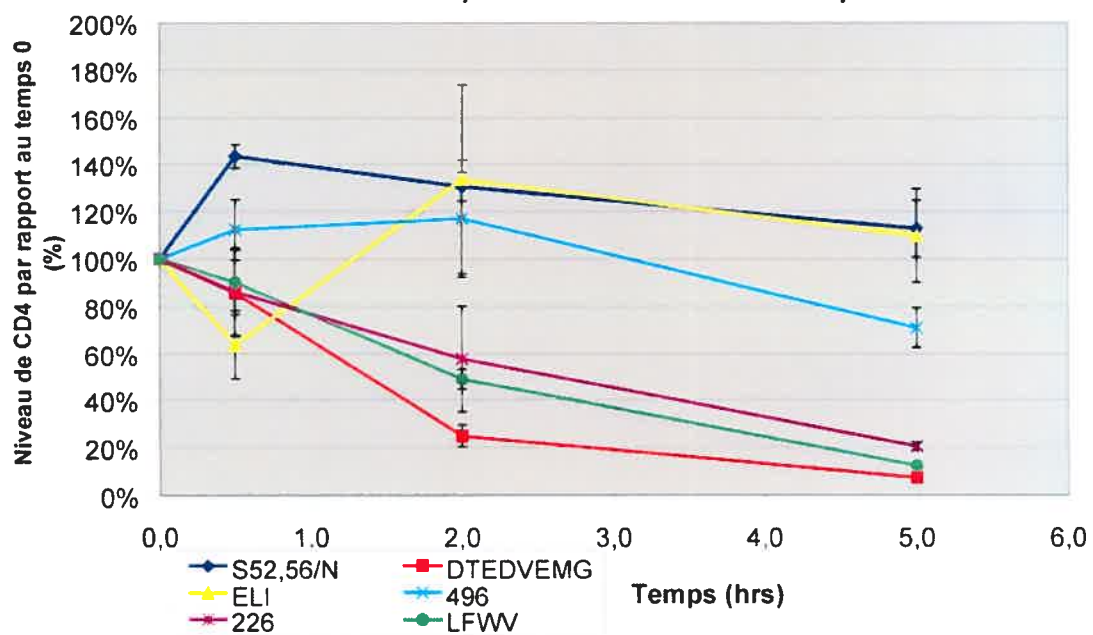


A.



B.


Cinétique de dégradation du CD4 induit par la protéine Vpu de divers isolats primaires lorsqu'une quantité normalisée d'ADN est transfectée pour chacun des vecteurs d'expression



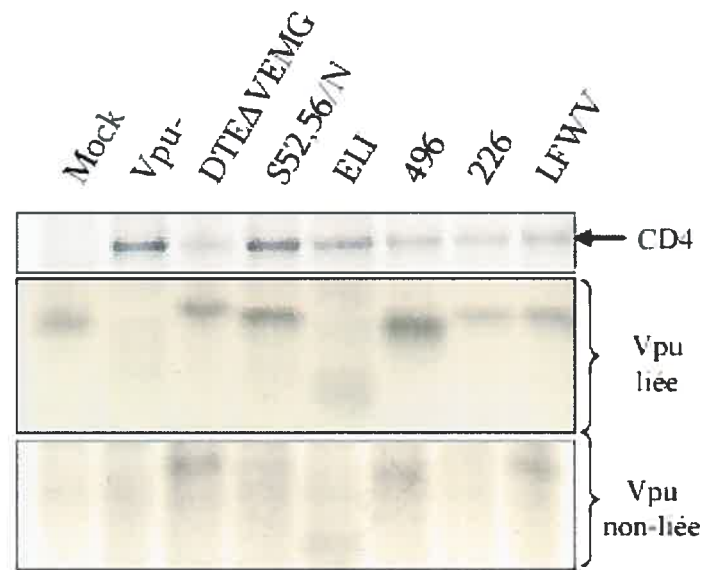
incapacité à recruter β -TrCP est causée par le remplacement des résidus sérines par des résidus asparagines, empêchant ainsi leur phosphorylation. La protéine Vpu provenant des isolats primaires 226 et LFWV ont toutefois une courbe de cinétique de dégradation comparable à celle d'une protéine Vpu fonctionnelle pour la dégradation de CD4 (figure 19B). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et permettent de mettre en évidence que les protéines Vpu provenant des isolats ELI et 496 ont effectivement une plus faible capacité à induire la dégradation de la molécule CD4. Une immunoprécipitation effectuée avec un anticorps anti-Vpu dirigé en partie contre une portion du dodécapeptide non-phosphorylée de Vpu a permis de démontrer que les protéines Vpu sont exprimées dans les cellules où le CD4 est co-exprimé. Cependant, étant donné que l'anticorps ne reconnaît que les formes non-phosphorylées, une faible quantité de protéines est visible sur l'autoradiogramme.

Il est connu que l'interaction entre la partie C-terminale de Vpu et la queue cytoplasmique de CD4 est nécessaire, mais non suffisante à l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu (208, 277). De plus, la phosphorylation des résidus sérines en position 52 et 56 de Vpu est nécessaire pour qu'il puisse y avoir un recrutement efficace de β -TrCP et le recrutement subséquent du système ubiquitine-protéasome nécessaire à la dégradation du CD4 (209). Une diminution de l'affinité et/ou de l'avidité de Vpu pour l'une ou l'autre de ces protéines pourrait entraîner une diminution de l'efficacité de la dégradation du CD4 induite par Vpu. Afin de déterminer si le défaut au niveau de la capacité à induire la dégradation du CD4 par Vpu provenant de ces isolats primaires est dû à une diminution de l'affinité et/ou de l'avidité de Vpu pour CD4 ou pour β -TrCP, des tests permettant d'évaluer le pourcentage de liaison à CD4 et à β -TrCP ont été effectués. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec une quantité d'ADN normalisée des expresseurs de Vpu (SVCMV) codant pour la protéine Vpu provenant d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires, et avec soit un expresseur de CD4 ou un expresseur de β -TrCP. Les cellules ont été soumises, 48 heures suivant la transfection, à une étape de carence en présence ou non de BFA selon le test, puis radiomarquées au ^{35}S -translabel. L'étape de carence en présence de BFA permettra aux protéines CD4 qui seront subséquentement produites d'être retenues artificiellement au niveau du RE afin de simuler l'effet de rétention de la gp160. La protéine β -TrCP n'étant pas normalement retenue au niveau du RE lors de l'infection virale, l'étape de carence est effectuée en absence de BFA. Les protéines CD4 et Vpu ou β -TrCP et Vpu, selon l'expérience, ont été immunoprécipitées de manière séquentielle à partir des lysats cellulaires, afin de déterminer l'efficacité de la liaison entre Vpu et CD4 ou entre Vpu et β -TrCP. La figure 20A démontre que tous les échantillons sont en mesure de lier le CD4 retrouvé au niveau du RE, peu importe si Vpu provient d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires. Afin de calculer le pourcentage de liaison de Vpu à CD4, une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée. Ce pourcentage a été calculé en divisant la quantité de Vpu lié à CD4 par la quantité de Vpu totale (Vpu liée additionné à la quantité de Vpu non liée),

Figure 20 : Les protéines Vpu provenant de certains isolats primaires ont la capacité de se lier de façon similaire à CD4 et à β -TrCP comparativement à un isolat de laboratoire et ce, après normalisation de leur quantité d'ADN transfectée en fonction d'un équivalent de protéines détectées pour une quantité donnée d'ADN de SVCMV-Vpu DTE Δ VEMG.

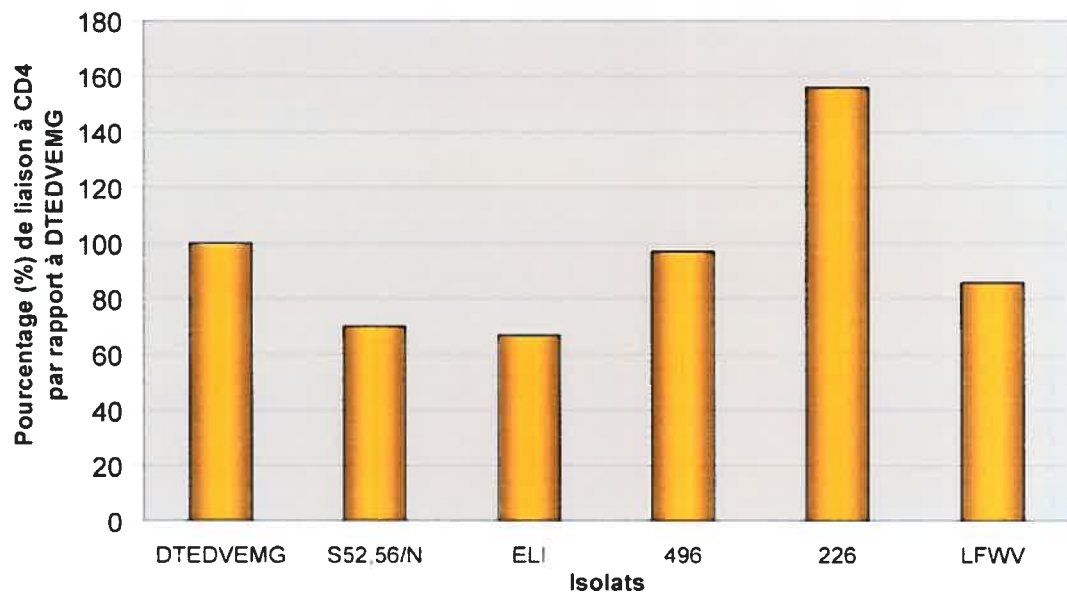
- A.** Des cellules 293T ont été co-transfectées avec des expresseurs codant pour la protéine Vpu provenant d'isolats primaires ou d'isolats de laboratoire, (avec une quantité d'ADN normalisée) ainsi qu'avec SVCMV-CD4. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules sont soumises à une étape de carence en présence de BFA. Après un marquage métabolique au ^{35}S -translabel, les complexes Vpu-CD4 ont été immunoprécipités à partir des lysats cellulaires à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre CD4 (OKT4). Les protéines Vpu non-liées ont été immunoprécipitées subséquemment à l'aide de l'anticorps polyclonal R21S dirigé contre Vpu. Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie. Résultat d'une expérience.
- B.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage de Vpu qui est liée à CD4 pour chacun des isolats étudiés. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant aux complexes Vpu-CD4 pour chacun des échantillons a été mesurée à partir de l'autoradiogramme. Le pourcentage de Vpu liée à CD4 a été calculé en divisant la quantité de Vpu liée par la quantité de Vpu totale (quantité de Vpu lié au CD4 additionné à la quantité de Vpu non-liée au CD4), puis en divisant par la quantité de CD4 retrouvée dans chacun des échantillons.
- C.** Des cellules 293T ont été co-transfectées avec des expresseurs codant pour la protéine Vpu provenant d'isolats primaires ou d'isolats de laboratoire, (avec une quantité normalisée d'ADN) ainsi qu'avec pCDNA3- β -TrCP. Les cellules sont soumises à une étape de carence 48 heures après la transfection. Après un marquage métabolique au ^{35}S -translabel, les complexes Vpu- β -TrCP ont été immunoprécipités à partir des lysats cellulaires à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre myc (9E10). Les protéines Vpu non-liées ont été immunoprécipitées subséquemment à l'aide de l'anticorps polyclonal R21S dirigé contre Vpu. Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie. Figure représentative de deux expériences indépendantes.
- D.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage de Vpu qui est liée à β -TrCP pour chacun des isolats étudiés. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant aux complexes Vpu- β -TrCP pour chacun des échantillons a été mesurée à partir de l'autoradiogramme. Le pourcentage de Vpu liée à β -TrCP a été calculé en divisant la quantité de Vpu liée par la quantité de Vpu totale (quantité de Vpu liée à β -TrCP additionnée à la quantité de Vpu non-liée à β -TrCP), puis en divisant par la quantité de β -TrCP retrouvée dans chacun des échantillons. 

A.

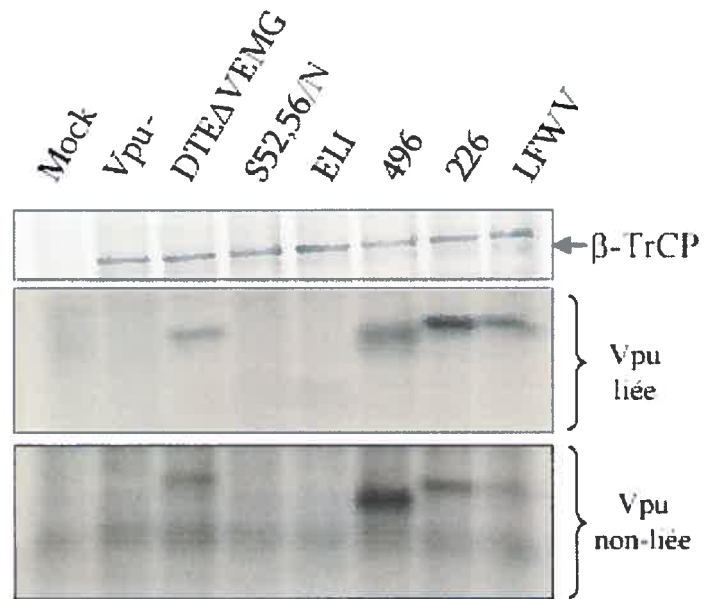


B.

Capacité de liaison à CD4 de la protéine Vpu provenant de divers isolats primaires lorsqu'une quantité d'ADN normalisée est transfectée

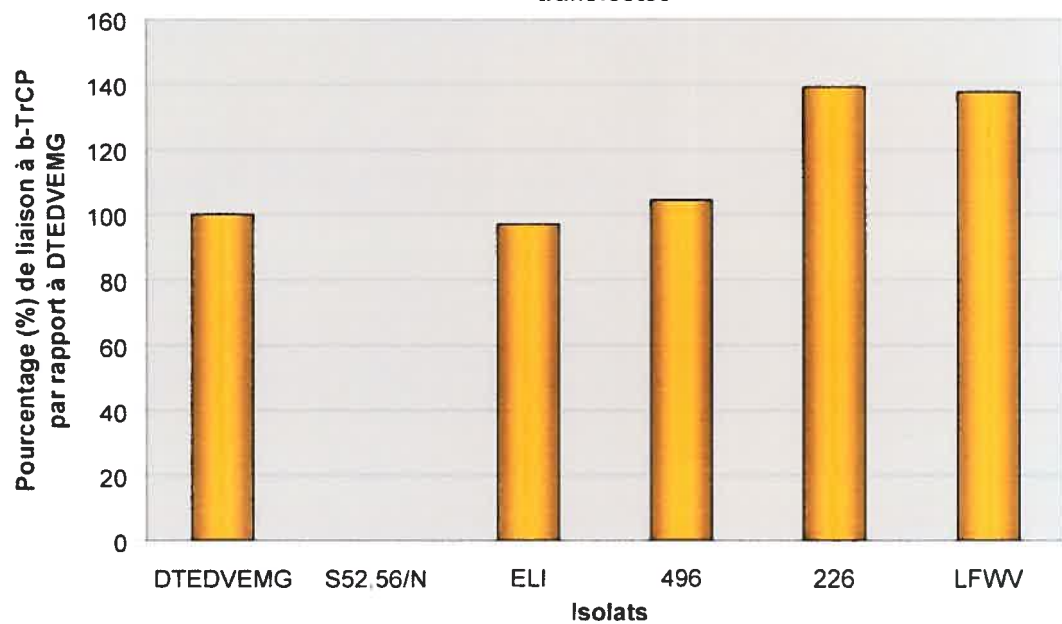


C.



D.

Capacité de liaison à b-TrCP de la protéine Vpu provenant de divers isolats primaires lorsqu'une quantité d'ADN normalisée est transfectée



puis en normalisant pour la quantité de CD4 retrouvé dans chacun des échantillons. Cette analyse a permis de constater que la protéine Vpu provenant des isolats primaires 496 et LFWV liait presque aussi bien le CD4 que l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (figure 20B), avec des pourcentages de liaison de 97%, 86% et 100% respectivement. L'isolat 226, quant à lui, lie plus fortement le CD4 que l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG, avec un pourcentage relatif de liaison de 155%. En effet, malgré qu'il y ait une quantité de CD4 similaire pour ces deux échantillons, la quasi totalité de la protéine Vpu provenant de l'échantillon 226 se retrouve lié à CD4, alors qu'une partie importante de Vpu DTEΔVEMG n'est pas lié au CD4, augmentant ainsi le rapport de Vpu liée sur Vpu totale. Par le fait même, le pourcentage de liaison de Vpu de l'échantillon 226 à CD4 s'en retrouve augmenté par rapport à celui retrouvé pour l'échantillon DTEΔVEMG. Seul le mutant S52,56/N et l'isolat primaire ELI montrent une diminution de l'ordre de 30% de l'efficacité de liaison à CD4, ce qui pourrait expliquer partiellement le défaut de dégradation du CD4 observé pour cet isolat. Toutefois, étant donné que l'anticorps anti-Vpu R21S utilisé pour ces expériences ne reconnaît que les formes non-phosphorylées de Vpu, nous pouvons sous-estimer la quantité de Vpu totale. En effet, les formes phosphorylées, mais non liées de Vpu ne seront pas reconnues par l'anticorps et donc, ne seront pas intégrées dans les calculs permettant d'établir les pourcentages de liaison à CD4. Nous pouvons cependant dire que dans ces conditions, tous les isolats primaires étudiés sont en mesure de lier le CD4 présent au niveau du RE au moins à 70% et plus de la capacité de liaison de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG. Toutefois, cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois et devra être répétée. Cependant, des résultats obtenus précédemment en duplicata avec l'anticorps anti-Vpu 4H₁₀LC, qui reconnaît autant les formes phosphorylées que non-phosphorylées de Vpu et qui est dirigé contre la portion C-terminale de Vpu, ont montré que les protéines Vpu provenant de tous les isolats primaires conservaient leur capacité à se lier à CD4 aussi bien, sinon plus, que l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (données non-montrées).

En ce qui concerne la capacité de liaison de la protéine Vpu provenant d'isolats primaires à β -TrCP, la figure 20C démontre que outre le mutant S52,56/N qui est connu pour ne pas être en mesure de recruter β -TrCP (111), tous les autres isolats ont maintenu un certain degré de liaison à β -TrCP. La quantification par densitométrie des bandes retrouvées sur l'autoradiogramme a permis de calculer le pourcentage de liaison de la protéine Vpu à la protéine β -TrCP. Ce pourcentage est calculé en divisant la quantité de Vpu liée à β -TrCP par la quantité de Vpu totale (quantité de Vpu liée à β -TrCP additionnée à la quantité de Vpu non-liée à β -TrCP), puis en divisant par la quantité de β -TrCP retrouvée dans chacun des échantillons. C'est ce qui est illustré à la figure 20D, où l'on voit clairement que la protéine Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496 lie β -TrCP de manière similaire à l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (97% et 105% respectivement), alors que les isolats primaires 226 et LFWV ont une forte affinité pour β -TrCP avec des pourcentages de liaison de l'ordre de 140%. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Ainsi, la diminution de la capacité à induire

la dégradation du CD4 par les protéines Vpu provenant des isolats ELI et 496 ne peut être attribuable à une diminution de leur capacité à recruter β -TrCP et au recrutement subséquent du système de dégradation protéique ubiquitine-protéasome cellulaire. Étant donné que le même anticorps anti-Vpu a été utilisé (R21S), nous sous-estimons encore une fois la quantité de Vpu total, puisque les formes de Vpu phosphorylées qui ne sont pas liées à β -TrCP ne peuvent pas être détectées. Cependant, des résultats obtenus en duplicata avec l'anticorps anti-Vpu 4H₁₀LC, qui reconnaît autant les formes phosphorylées que non-phosphorylées de Vpu et qui est dirigé contre la portion C-terminale de Vpu, montraient que les protéines Vpu provenant de tous les isolats primaires étaient en mesure de lier CD4 et β -TrCP aussi bien, sinon plus, que l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (données non-montrées). Ceci suggère que les pourcentages de liaison de Vpu à CD4 et à β -TrCP, évalués à partir des données recueillies lors de l'immunoprécipitation de Vpu à l'aide de l'anti-Vpu R21S, n'ont pas été trop sous-estimés. Les résultats présentés dans cette section démontrent clairement que la protéine Vpu de certains isolats primaires est incapable d'induire la dégradation du CD4 correctement, mais que ce défaut n'est pas imputable à une diminution importante de l'affinité et /ou avidité de Vpu pour le CD4 et/ou pour le facteur cellulaire β -TrCP.

Capacité de rétention intracellulaire de la molécule CD4 par la protéine Vpu provenant de divers isolats primaires

Nous avons vu jusqu'à maintenant que la protéine Vpu provenant de certains isolats primaires est incapable d'induire une dégradation efficace du CD4. Cependant, cette incapacité ne semble pas être due à une diminution de l'affinité et/ou avidité de Vpu pour les molécules CD4 et β -TrCP, étant donné que les protéines Vpu provenant des divers isolats primaires conservent une bonne capacité de liaison à ces molécules. Comme nous croyons qu'il soit possible qu'il existe deux voies distinctes de régulation négative du CD4 par Vpu, soit via l'induction de la dégradation du CD4 et/ou sa rétention intracellulaire, nous avons voulu vérifier si nous étions en mesure de démontrer un effet de rétention du CD4 par la protéine Vpu de certains isolats primaires. Pour ce faire, un système utilisant un marquage cellulaire du CD4 retrouvé à la surface et un marquage de la totalité des molécules CD4 a été mis au point. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec des quantités croissantes d'expressor de Vpu (SVCMV) dont la protéine Vpu provient d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires avec une quantité fixe d'un expressor de CD4 (SVCMV-CD4-T4/LTR). Dans ce système, l'absence de BFA permet le transit normal de Vpu et de CD4. L'utilisation de quantité croissante d'expressor nous permet de comparer un même échantillon avec lui-même. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été lavées extensivement et incubées en présence d'un anticorps dirigé contre CD4, suite à la perméabilisation des cellules ou non. Les protéines ont été détectées en utilisant des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, puis ont été

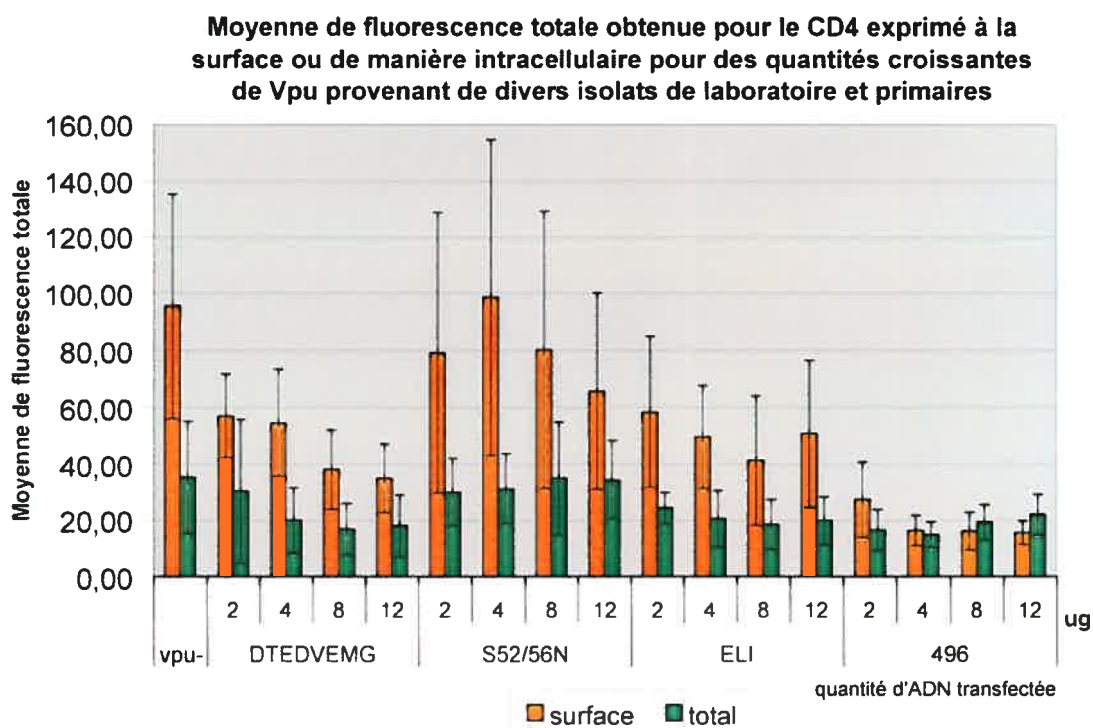
visualisées par FACS et la moyenne de fluorescence totale a été évaluée. À la figure 21A, il est d'abord possible de constater que de manière générale, les valeurs obtenues pour la moyenne de fluorescence de CD4 total sont plus faibles que les valeurs obtenues pour la moyenne de fluorescence de CD4 à la surface. Ceci s'explique par le fait que lors de la perméabilisation des membranes cellulaires, une grande quantité de CD4 est perdue. Si on regarde maintenant notre contrôle de dégradation, soit l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG, il est possible de constater que plus la quantité de Vpu augmente, plus on observe une diminution à la fois du CD4 retrouvé à la surface et du CD4 total, ce qui indique qu'il y a dégradation efficace du CD4 en présence de ce Vpu. En ce qui concerne le mutant S52,56/N, connu comme étant incapable d'induire la dégradation du CD4 (111), on constate que pour une quantité croissante de Vpu, la quantité de CD4 total demeure relativement la même, alors qu'une légère diminution de la moyenne de fluorescence du CD4 retrouvé à la surface est observée. Ceci semble indiquer qu'à de hauts niveaux d'expression, le mutant S52,56/N serait en mesure de retenir le CD4 de façon intracellulaire sans toutefois induire sa dégradation. Pour ce qui est de l'isolat primaire ELI, pour lequel nous avons décelé un défaut de sa capacité à induire la dégradation du CD4, la figure 21A démontre que pour une quantité croissante de Vpu, le niveau de CD4 total reste sensiblement le même, alors que le niveau de CD4 retrouvé à la surface cellulaire tend à diminuer très légèrement. Ce résultat suggère que la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI pourrait avoir une faible capacité à retenir intracellulaire le CD4. Finalement, la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 semble avoir un effet marqué sur l'expression du CD4 à la surface des cellules étant donné que même à une faible concentration de Vpu, il y a une forte diminution de la quantité de CD4 retrouvée à la surface cellulaire. De plus, on constate que malgré une quantité de CD4 total qui est constante avec l'augmentation croissante de Vpu, il y a une légère diminution du CD4 à la surface lorsque 4 µg d'ADN de Vpu est utilisé. Toutefois, cette diminution semble se stabiliser suite à l'augmentation subséquente de la quantité de Vpu utilisée. Ceci suggère que la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 a une forte capacité de retenir le CD4 de manière intracellulaire et que cet effet serait saturable. En effet, une faible quantité de Vpu provenant de cet isolat semble être suffisante pour réguler négativement de manière importante le CD4 exprimé à la surface des cellules et cet effet n'est pas amplifié avec une augmentation croissante de la protéine. Il est à noter que ces expériences ont été reproduites au moins quatre fois et que malgré de larges barres d'erreurs (représentant l'écart type mesuré sur quatre expériences indépendantes), toutes les expériences, traitées individuellement, nous donnaient des courbes d'allures similaires. Les différences importantes au niveau de ces barres d'erreurs peuvent s'expliquer par le fait que la détermination du zéro pour le contrôle négatif (cellules non-transfectées et cellules transfectées avec CD4 et Vpu) est effectuée manuellement et peut dépendre de l'état des cellules d'une expérience à une autre. Une analyse quantitative des données obtenues au FACS nous a permis d'établir un ratio entre l'expression de CD4 à la surface cellulaire et l'expression de CD4 total. Ainsi, une diminution

Figure 21 : Certains isolats primaires sont en mesure de retenir la molécule CD4 de manière intracellulaire.

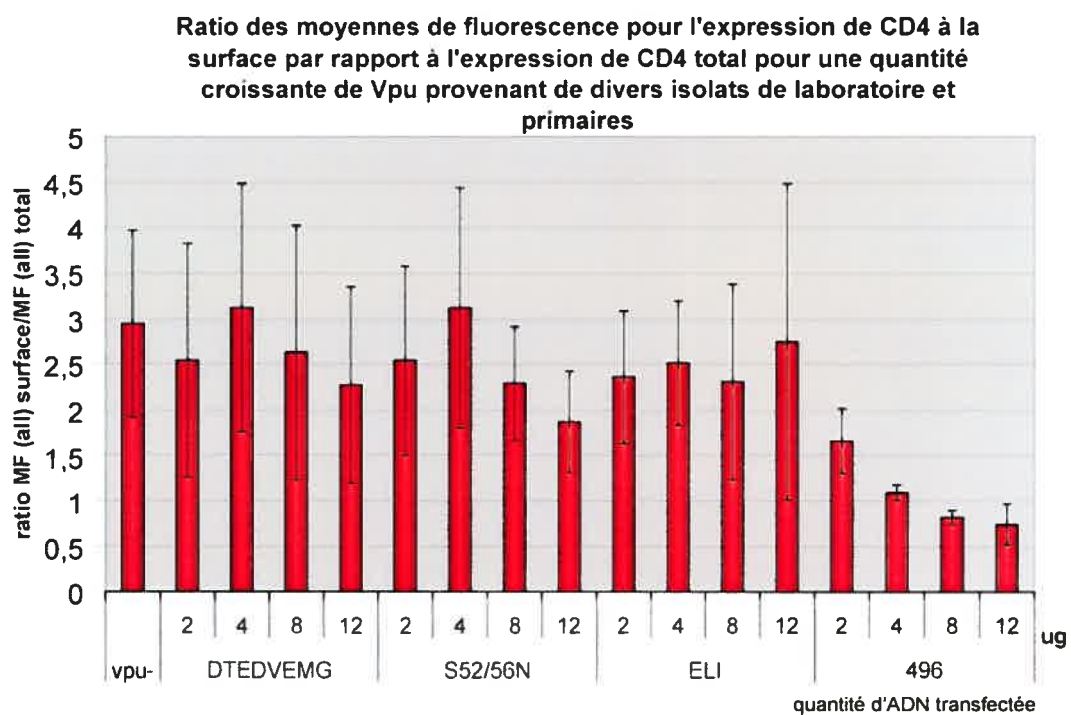
- A.** Des cellules 293T ont été co-transfectées avec des quantités croissantes des expresseurs codant pour la protéine Vpu provenant d'isolats de laboratoire ou d'isolats primaires et avec le plasmide SVCMV CD4-T4/LTR, codant pour le gène du CD4 humain. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été ou non perméabilisées avec de la saponine. Les cellules ont ensuite été marquées à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre CD4 (OKT4), lavées et marquées subséquentment avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor® 488. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur® cytometer pour l'expression de CD4 total ou de surface. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur quatre expériences indépendantes.
- B.** Une analyse quantitative a été effectuée afin de déterminer les ratios de l'expression de CD4 à la surface par rapport à l'expression de CD4 total pour chacun des échantillons. Les ratios ont été calculés en divisant la moyenne de fluorescence totale obtenue pour le niveau de CD4 exprimée à la surface par la moyenne de fluorescence totale obtenue pour le niveau de CD4 total. Les barres d'erreurs sur le graphique représentent l'écart type calculé sur quatre expériences indépendantes.



A.



B.



du ratio indique qu'il y a effectivement moins de CD4 à la surface cellulaire par rapport à une quantité de CD4 qui serait constante. Si les deux paramètres diminuent, on devrait alors observer une certaine constance du ratio surface/total. La figure 21B est une représentation graphique des ratios obtenus pour chacun des échantillons pour des concentrations croissantes de la protéine Vpu. Le graphique présenté à la figure 21B démontre que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG semble, malgré certaines variations, avoir un ratio relativement constant puisque celui-ci est de 2,5 à une concentration de 2 µg d'ADN et de 2,25 à une concentration de 12 µg d'ADN, montrant que cet isolat est en mesure d'induire la dégradation du CD4. Pour ce qui est du mutant S52,56/N, il semble y avoir une légère diminution du ratio qui passe de 3 à 1,75, suggérant un léger effet de rétention du CD4. En ce qui concerne la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI, les ratios sont suffisamment constants pour suggérer que le léger effet de dégradation pourrait être en mesure de masquer l'effet de rétention. Cependant, étant donné l'importance des barres d'erreurs sur les ratios, il est difficile de conclure définitivement. Le seul échantillon pour lequel la diminution du ratio et les faibles barres d'erreurs nous permettent de conclure, est l'échantillon 496. En effet, il est possible de remarquer une diminution du ratio avec l'augmentation de la concentration de Vpu, montrant ainsi que malgré une quantité de CD4 totale constante, il y a une diminution relativement importante du CD4 exprimé à la surface cellulaire dès l'utilisation de 2 µg d'ADN. Ainsi, ce résultat semble confirmer que la protéine Vpu provenant de cet isolat est en mesure de retenir intracellulairement le CD4 sans toutefois être capable d'induire sa dégradation.

La protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 a une plus grande stabilité que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG

Les résultats présentés jusqu'à maintenant indiquent que la protéine Vpu de certains isolats primaires est incapable d'accomplir correctement la fonction de dégradation du CD4, malgré le fait que Vpu soit en mesure de lier à la fois CD4 et β-TrCP. Ainsi, ce défaut ne semble pas être imputable à une diminution importante de l'affinité et/ou avidité de Vpu pour le récepteur viral et la molécule cellulaire β-TrCP. Étant donné que nous avons montré que la régulation négative du CD4 par Vpu peut se faire soit via l'induction de la dégradation du CD4 et/ou sa rétention intracellulaire, nous avons voulu vérifier si ce dernier phénomène pouvait se produire suite à une augmentation de la stabilité de Vpu en soi. Effectivement, une augmentation de la stabilité de la protéine Vpu impliquerait qu'une plus grande quantité de molécules de Vpu serait retrouvée à un même moment au niveau du RE, permettant de séquestrer une grande quantité de CD4 et ce, malgré une incapacité à induire sa dégradation. La stabilité de Vpu dans le temps et durant le transport normal de la protéine pourrait donc permettre de séquestrer efficacement le CD4 de manière intracellulaire. Des cellules 293T ont été transfectées avec des expresseurs de Vpu (SVC MV) codant pour l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG ou pour la protéine Vpu

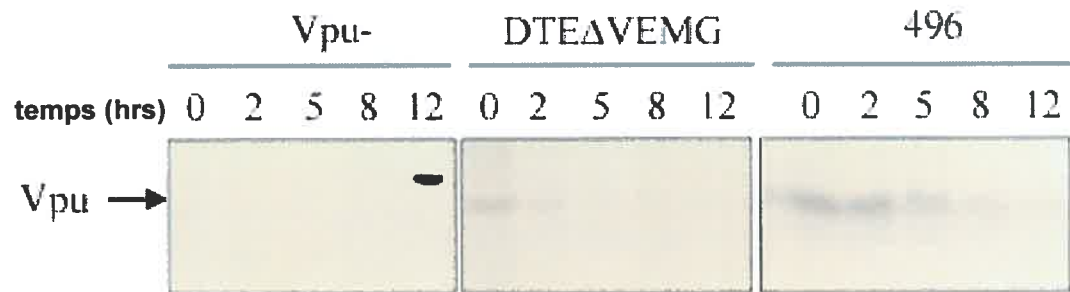
provenant de l'isolat primaire 496 et ELI. Les cellules ont été lavées 48 heures après la transfection, et soumises à une étape de carence en absence de BFA, de manière à permettre le transport normal de Vpu dans la cellule. Les cellules ont ensuite été marquées au ^{35}S -translabel. À différents temps, les cellules ont été recueillies, puis lysées et les protéines Vpu ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires à l'aide de l'anti-Vpu R21S. Nous avons dû utiliser cet anticorps plutôt que l'anti-Vpu 4H₁₀LC, puisque ce dernier ne reconnaît pas la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496. La figure 22A démontre que la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est beaucoup plus stable dans le temps lorsque comparée à la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG. En effet, une grande quantité de protéine Vpu est encore observable au temps 5 heures pour l'isolat 496 alors qu'il est possible de constater une diminution importante de la quantité de Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG deux heures après le début du marquage métabolique. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. En ce qui concerne la stabilité de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI, celle-ci n'a pu être établie dû à la difficulté d'obtenir un signal suffisamment fort pour paraître clairement sur l'autoradiogramme et ce, malgré une exposition prolongée (données non montrées). Toutefois, le faible signal obtenu ne semblait pas montrer une augmentation de la stabilité pour ce variant. L'analyse quantitative effectuée par densitométrie a permis de calculer le pourcentage de dégradation de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 et de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG. Il est donc possible de constater à la figure 22B qu'à un temps intermédiaire de 5 heures après le début du marquage, il reste moins de 20% de la quantité initiale de Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG alors que cette quantité est de plus de 95% en ce qui concerne l'isolat primaire 496. Cette figure permet aussi de démontrer que malgré les barres d'erreurs, la demi-vie de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est en moyenne de plus de 10 heures, alors que la demi-vie de la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG est d'environ 1 heure 30 minutes. Ainsi, ces résultats suggèrent que la plus grande stabilité de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 pourrait être impliquée dans un phénomène de rétention intracellulaire du CD4, palliant ainsi à un défaut de la fonction de dégradation du CD4 induite par Vpu. L'analyse de la séquence de l'isolat 496 nous a mené à considérer que les résidus lysines retrouvés en position 32 et 36, qui sont normalement des arginines dans la plupart des isolats de laboratoire et primaires, seraient peut-être importants pour l'augmentation de la stabilité de la protéine Vpu chez cet isolat. En effet, des études menées au laboratoire démontrent que certaines mutations dans la région située entre les acides aminés 30 et 38 de Vpu peuvent entraîner une augmentation de la stabilité de Vpu (données non publiées). Ceci suggère que le remplacement de ces résidus par des lysines pourrait entraîner un changement soit des charges, soit de la conformation de la première hélice α , ce qui conférerait à Vpu une protection contre sa dégradation naturelle et ainsi, augmenterait sa stabilité dans le temps. Toutefois, nous ne pouvons exclure que l'augmentation de la stabilité

Figure 22 : La protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est plus stable que la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG.

- A.** Des cellules 293T ont été transfectées soit avec l'isolat de laboratoire Vpu DTEΔVEMG ou avec l'isolat primaire 496 avec des quantités d'ADN normalisées. Dans les 48 heures suivant la transfection, les cellules ont subi une étape de carence pour une durée de 30 minutes. Après un marquage métabolique au ^{35}S -translabel, les cellules ont été recueillies et lysées aux temps indiqués. Les protéines Vpu marquées ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires à l'aide de l'anticorps polyclonal R21S dirigé contre Vpu. Les protéines ont été séparées sur SDS-PAGE et ont ensuite été révélées par autoradiographie. Figure représentative de deux expériences indépendantes.
- B.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le pourcentage de dégradation de Vpu par rapport au temps 0. À l'aide d'un densitomètre, la densité des bandes correspondant à Vpu aux différents temps a été mesurée à partir de l'autoradiogramme. Le pourcentage de dégradation de Vpu relativement au temps 0 a été calculé en divisant la quantité de Vpu mesurée aux différents temps par la quantité de Vpu retrouvée au temps 0. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé à partir des résultats obtenus de deux expériences indépendantes.

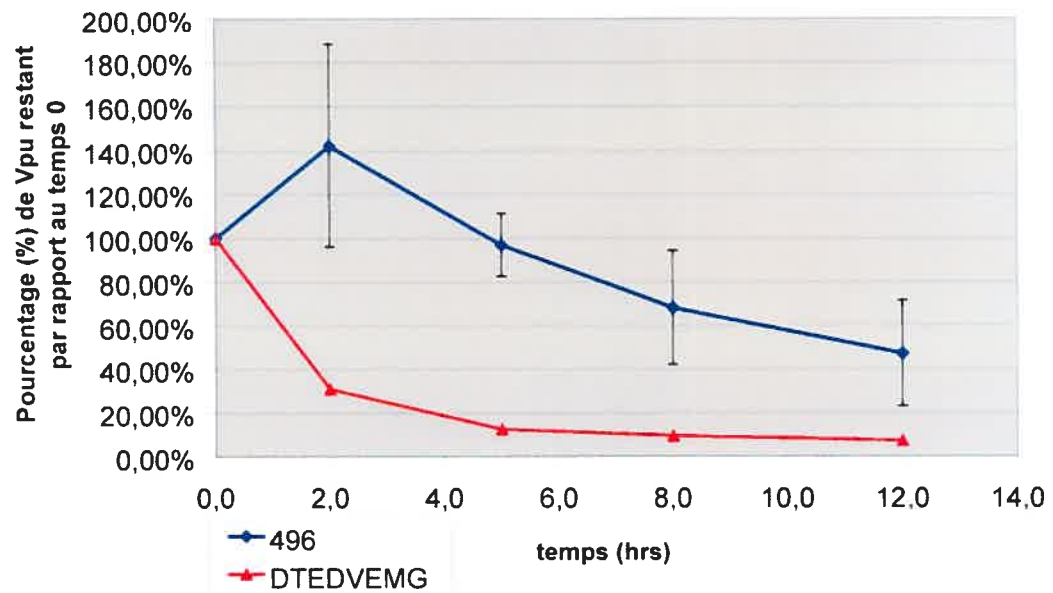


A.



B.

Stabilité de la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEDVEMG et de l'isolat primaire 496 relativement au temps 0



de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 par rapport à celle de l'isolat DTEΔVEMG ne soit en fait due uniquement à une augmentation de la stabilité des formes non-phosphorylées, plutôt qu'à l'augmentation de la stabilité des protéines totales. Étant donné que la liaison de CD4 à Vpu ne nécessite pas que celle-ci soit phosphorylée, une augmentation de la stabilité des seules formes non-phosphorylées de la protéine permettrait, si notre hypothèse est juste, qu'une grande quantité de Vpu stable dans le temps soit en mesure de lier et de séquestrer une quantité importante de CD4 à l'intérieur de la cellule. Ainsi, cette séquestration intracellulaire de CD4 par des formes stabilisées de Vpu dans le temps pourrait permettre de réguler négativement l'expression du CD4 à la surface des cellules et ainsi empêcher son incorporation dans les virions nouvellement formés. En effet, puisque la phosphorylation de Vpu n'est pas nécessaire à sa liaison à CD4, il peut y avoir séquestration intracellulaire du CD4 par une grande quantité de Vpu provenant de l'isolat 496, ce qui pourrait permettre la formation de particules virales ayant un plein potentiel infectieux. Ces résultats tendent à démontrer qu'il est possible que des mutations compensatoires puissent se produire de manière à permettre à une protéine Vpu, défective pour sa fonction de dégradation du CD4, de palier à ce défaut en retenant intracellulairement le CD4 via l'augmentation de la stabilité de la protéine.

Mesure de l'infectivité des particules virales produites à l'aide de variants de Vpu capables d'induire une rétention intracellulaire du CD4

Nous avons montré jusqu'à présent que certains isolats primaires ont un défaut dans leur capacité à induire la dégradation du CD4 par Vpu et que ce défaut ne semble pas être dû à une inefficacité de liaison à CD4 et/ou à β -TrCP. Nous avons vu aussi que la protéine Vpu de ces isolats primaires semble être en mesure de retenir le CD4 intracellulairement, phénomène qui pourrait être attribuable, du moins pour l'isolat primaire 496, à une augmentation de la stabilité de la protéine. Il serait même possible que cette augmentation de la stabilité de la protéine Vpu puisse être due à des mutations survenues dans la première hélice α du domaine cytoplasmique de Vpu. Notre hypothèse étant qu'il est possible que la protéine Vpu provenant d'isolats primaires soit en mesure de palier à un défaut de sa capacité à induire la dégradation du CD4 en retenant le CD4 intracellulairement et ce, afin de produire des particules virales ayant un plein potentiel infectieux, nous avons voulu vérifier l'infectivité des virions produits en présence de ces variants de Vpu. Il est en effet connu que la dégradation du CD4 induite par Vpu est responsable en partie de la modulation positive de l'infectivité du VIH-1 par Vpu au niveau des cellules exprimant le CD4 (190). De plus, de multiples publications ont été à même de mettre en évidence que la diminution de l'expression de CD4 induite par Nef et/ou Vpu contribue à la formation de particules virales infectieuses (34, 73, 181, 269), suggérant fortement que cette fonction confère un avantage sélectif au virus *in vivo*. Afin de comparer l'infectivité des particules virales produites en absence ou en présence de CD4 et de divers variants de Vpu,

nous avons utilisé un variant de Vpu provenant d'un isolat de laboratoire connu pour être en mesure d'induire la dégradation de CD4, ce qui a pour effet de moduler positivement l'infectivité des particules virales. Aussi, un mutant de Vpu dont le phénotype est associé à la fois à une perte de l'induction de la dégradation de CD4 induite par Vpu (111) et à une diminution importante du potentiel infectieux des particules virales produites en présence de CD4 a été utilisé (190). L'expresseur SVCMV-Vpu⁺ code pour une protéine Vpu fonctionnelle pour la dégradation tandis que l'expresseur SVCMV-S52,56/N code pour une protéine Vpu mutante dont les sites de phosphorylation ont été remplacés, empêchant l'initiation du processus de dégradation du CD4 induit par Vpu (111). Les provirus HxBH10-Vpu⁺ ou HxBH10-Vpu⁻ ont été co-transfectés avec le plasmide pHIV-CD4 ou non, les expresseurs de Vpu (SVCMV-Vpu⁺, SVCMV-S52,56/N, SVCMV-ELI, SVCMV-496 ou SVCMV-Vpu⁻) ou le plasmide contrôle dans les cellules 293T. Étant donné que le plasmide pHIV-CD4 est sous le contrôle des LTR, seules les cellules ayant été co-transfectées avec le provirus exprimeront du CD4. Dans les 48 heures suivant la transfection, les virus produits ont été recueillis et un essai MAGI a été effectué tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. La figure 23A démontre que les particules virales du VIH-1 ayant été produites en absence de CD4 avec les variants de Vpu⁻, Vpu⁺ et Vpu-ELI complémentés en *trans* ou avec un provirus HxBH10-Vpu⁺ possèdent un potentiel infectieux similaire. Les particules virales produites avec les variants de Vpu-S52,56/N et Vpu-496 complémentés en *trans* montrent une diminution de leur infectivité, malgré l'absence de CD4. Pourtant, il a été montré que l'infectivité des virus formés en absence de CD4, à partir d'un provirus dont les sérines 52 et 56 sont mutées, est similaire à ceux des provirus Vpu⁺ et Vpu⁻ (190). Cette différence pourrait être imputable au fait que les virus ont été produits avec la protéine Vpu complémentée en *trans* à partir de vecteurs d'expression, plutôt qu'en *cis* à partir de constructions provirales. Effectivement, l'expression des protéines virales, dans un contexte d'infection, est régulé par les gènes régulateurs *tat* et *rev*, régulation qui est inexistante lorsque les protéines sont exprimées à partir de vecteurs d'expression. Ainsi, dépendamment de la quantité d'ADN transfectée à partir d'un vecteur d'expression, des variations importantes au niveau de l'expression de la protéine Vpu pourraient être observées comparativement à son niveau d'expression normalement retrouvé dans un contexte physiologique d'infection. Pour ce qui est de l'infectivité des particules virales produites en absence de CD4 avec le variant de Vpu 496 complémentés en *trans*, nous croyons qu'il est possible que ce variant soit tout simplement moins infectieux au départ. Pour s'en assurer, il serait nécessaire d'effectuer des cinétiques de réplication avec un provirus HxBH10 dont le gène *vpu* aurait été remplacé par celui de l'isolat primaire 496. En effet, en comparant les cinétiques de réplication obtenues pour l'isolat primaire 496 et celles obtenues pour l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG, on devrait être en mesure de constater un retard dans la cinétique de réplication provenant de l'isolat 496 si celui-ci est moins infectieux. Il est intéressant de noter que lorsque les virus sont produits en présence de CD4, il est possible de constater une diminution importante de l'infectivité des particules

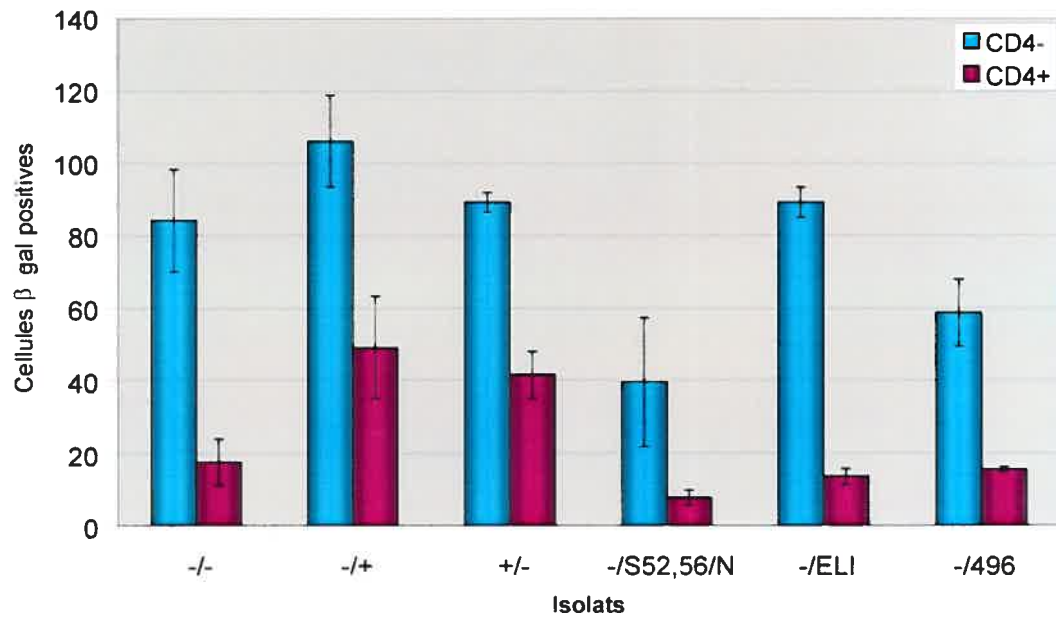
Figure 23 : L'infectivité des particules virales produites par complémentation en *trans* à l'aide du gène *vpu* provenant d'isolats primaires est altérée en présence de CD4, à faible multiplicité d'infection

- A.** Les cellules 293T ont été co-transfectées avec la construction provirale HxBH10-Vpu⁻ ou HxBH10-Vpu⁺, une quantité fixe de pHIV-CD4 ou non et les expresseurs de Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et d'isolats primaires. Les cellules ainsi que les surnageants ont été récoltés 48 heures post-transfection. L'infectivité des virus produits pour chacune des cultures a été déterminée par essai MAGI. Les cellules HeLa-CD4-β-Gal ont été infectées pour une période de 48 heures avec des quantités similaires de virus, tel que déterminé par l'activité RT (40 000cpm de RT). Dans les 48 heures suivant l'infection, les cellules ont été fixées et colorées avec du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranoside). Le nombre de cellules infectées a été déterminé en comptant le nombre de cellules bleues β-Gal positives. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur trois expériences effectuées en parallèle à partir des mêmes échantillons viraux. La légende suivante s'applique : -/- : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu⁻, -/+ : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu⁺, +/- : HxBH10-Vpu⁺ + SVCMV-Vpu⁻, -/S52,56/N : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu S52,56/N, -/ELI : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu ELI, -/496 : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu 496.
- B.** Le pourcentage relatif d'infectivité des virus produits dans chacune des cultures a été déterminé. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage relatif où l'infectivité des virus Vpu⁺ prend de façon arbitraire la valeur de 100%, en absence de CD4. Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur trois expériences effectuées en parallèle à partir des mêmes échantillons viraux. La légende suivante s'applique : -/- : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu⁻, -/+ : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu⁺, +/- : HxBH10-Vpu⁺ + SVCMV-Vpu⁻, -/S52,56/N : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu S52,56/N, -/ELI : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu ELI, -/496 : HxBH10-Vpu⁻ + SVCMV-Vpu 496.



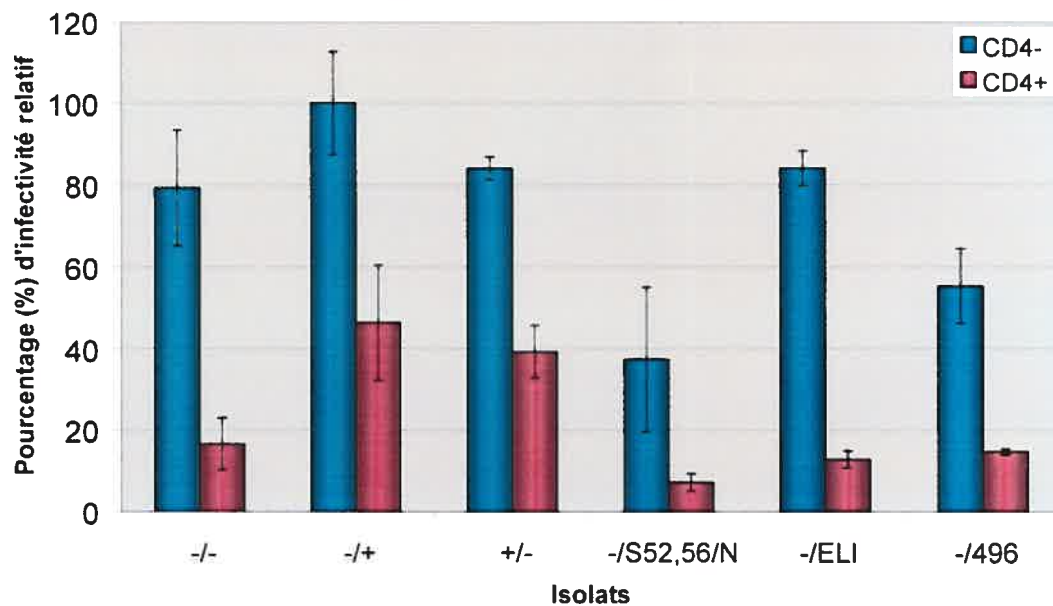
A.

Infectivité des particules virales produites par complémentation en *trans* de Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et primaires, à faible multiplicité d'infection, tel que déterminé par essai MAGI



B.

Pourcentage d'infectivité relatif des particules virales produites par complémentation en *trans* de Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et primaires, à faible MOI



virales ayant été produites par complémentation en *trans* avec les expresseurs de Vpu S52,56/N, ELI et 496 (Figure 23A). En fait, le potentiel infectieux de ces virus est similaire à celui obtenu avec les virus Vpu⁻ dans les mêmes conditions. Toutefois, lorsque les virus sont produits en présence de CD4 et d'un isolat Vpu⁺, il est aussi possible d'observer une diminution du potentiel infectieux des virions, bien que cette différence soit moins importante que celle obtenue avec les autres variants de Vpu. Cette différence d'infectivité n'a pas été observée lorsque des virus Vpu⁺ sont produits en *cis* (190). Il est toutefois possible d'expliquer cette diminution du potentiel infectieux des virus produits avec un isolat Vpu⁺ complémenté en *trans*, en présence de CD4, par la différence au niveau des expresseurs de CD4 qui ont été utilisés. Effectivement, certaines observations personnelles ont montré que les niveaux d'expressions de CD4 obtenus pour une même quantité d'ADN transfectée avec le plasmide pHIV-CD4 permet d'obtenir de plus hauts taux de CD4 exprimés que le plasmide SVCMV-CD4 qui a été utilisé dans l'étude précédente. Cependant, étant donné qu'il est possible d'observer une diminution encore plus importante de l'infectivité des particules virales produites en présence de CD4 lorsque Vpu⁻ est complémenté en *trans*, nous sommes tout de même en mesure de croire que ces résultats sont valables. Contrairement à nos attentes, ces résultats démontrent clairement qu'en présence de CD4 et à faible multiplicité d'infection (2 cpm/cellule), les variants de Vpu provenant d'isolats primaires capables de retenir le CD4 intracellulairement, mais incapable d'induire sa dégradation, ne sont pas en mesure de produire des particules virales totalement infectieuses. D'ailleurs, le potentiel infectieux est similaire à celui des virions produits dans les mêmes conditions, mais en absence de Vpu, et est donc loin d'être comparable à celui de virus ayant un variant fonctionnel pour l'induction de la dégradation du CD4. Ainsi, ces résultats démontrent que la capacité de rétention du CD4 de façon intracellulaire de ces variants de Vpu ne permet pas de compenser pour une fonction de dégradation de CD4 efficace. À la figure 23B, les pourcentages relatifs d'infectivité ont été calculés en donnant une valeur arbitraire de 100% au virus produit en absence de CD4 avec un isolat Vpu⁺ complémenté en *trans*. Ces résultats démontrent aussi que le pourcentage d'infectivité relatif des virions ayant été produits en présence de CD4, avec Vpu provenant du mutant S52,56/N et des isolats primaires ELI et 496 complémenté en *trans*, est similaire au pourcentage obtenu avec un isolat Vpu⁻ dans les mêmes conditions (soit 7%, 12%, 14% et 16% respectivement). Cependant, cette expérience a été effectuée en triplicata à partir des mêmes échantillons viraux. Il serait donc préférable de refaire cette expérience à partir de nouveaux stocks viraux, en prenant soin de diminuer la quantité de pHIV-CD4 transfectée, de manière à ne pas surcharger le système.

Mesure de l'incorporation du CD4 à l'intérieur des particules virales produites par complémentation en *trans* à l'aide de variants de Vpu provenant d'isolats de laboratoire ou primaires

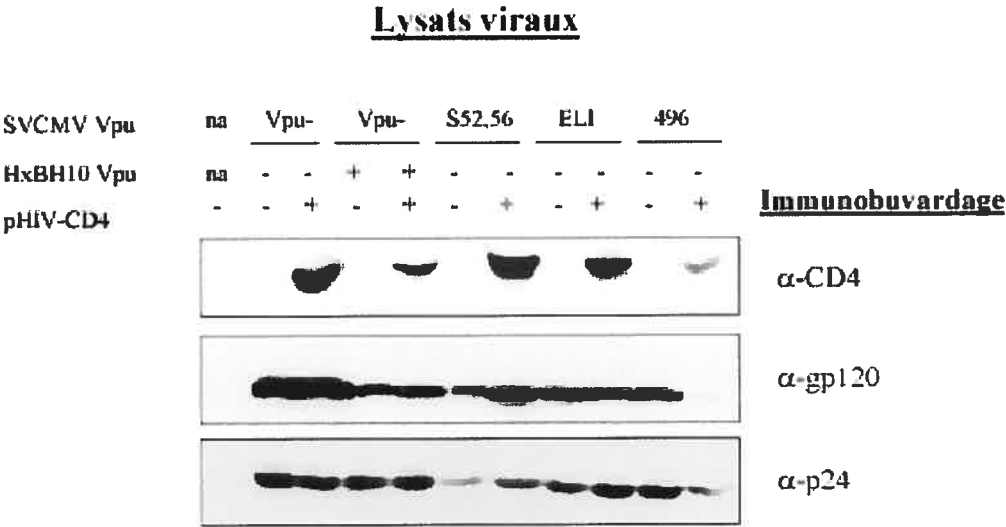
Afin de comprendre davantage le mécanisme moléculaire impliqué dans la diminution de l'infectivité des particules virales produites avec la protéine Vpu, provenant d'isolats primaires capable de retenir intracellulairement le CD4, complémentée en *trans*, nous avons analysé la composition protéique des virions produits dans les cellules 293T en absence et en présence de CD4. En premier lieu, nous avons voulu déterminer si la régulation négative du CD4 due à la rétention intracellulaire de celui-ci par Vpu permet tout de même qu'il y ait incorporation du CD4 dans les particules virales. En second lieu, nous voulions vérifier si les niveaux de CD4 incorporés dans ces particules virales sont comparables à ceux retrouvés dans des virions ayant été produits en présence d'une protéine Vpu capable d'induire la dégradation du CD4, ou plutôt à ceux retrouvés dans des virions ayant été produits en l'absence de Vpu. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec soit pHIV-CD4 ou le plasmide contrôle, et soit la construction provirale HxBH10-Vpu⁺ ou HxBH10-Vpu⁻ et le vecteur d'expression codant pour la protéine Vpu provenant soit d'isolats de laboratoire (SVCMV-Vpu⁻, SVCMV-Vpu⁺ et SVCMV-S52,56/N) ou d'isolats primaires (SVCMV-ELI et SVCMV-496). Dans les 48 heures suivant la transfection, les surnageants clarifiés et les cellules ont été récoltés. Les surnageants clarifiés ont été utilisés soit pour déterminer l'infectivité par essai MAGI, soit pour concentrer les virions par ultracentrifugation afin d'en analyser la composition protéique. Une même quantité de virions concentrés, tel que déterminé par essai RT, a été lysée directement dans du tampon Laemli, séparée sur SDS-PAGE, puis transférée sur membrane de nitrocellulose afin d'effectuer une analyse par immunobuvardage (Western Blot) en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre CD4, la gp120 ou la p24. Les complexes immuns provenant des lysats cellulaires ont aussi été séparés par SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose afin d'effectuer, tel que mentionné ci-haut, une analyse par immunobuvardage. Les résultats retrouvés à la figure 24A démontrent qu'en présence d'un provirus codant pour une protéine Vpu capable d'induire la dégradation de CD4, le niveau de CD4 incorporé dans les particules virales diminue de manière importante lorsque comparé à un provirus HxBH10-Vpu⁻. D'ailleurs, l'étude de Lévesque et ses collaborateurs avait déjà démontré l'existence de cette diminution du niveau de CD4 incorporé dans les particules virales, en présence d'un provirus ayant un gène *vpu* fonctionnel pour la dégradation du CD4 (190). De manière intéressante, le niveau de CD4 retrouvé dans les particules virales formées avec un provirus HxBH10-Vpu⁻ complémenté en *trans* avec l'expresseur SVCMV-ELI semble être légèrement plus faible que lorsqu'un expresseur Vpu non-fonctionnel (Vpu⁻) est utilisé (figure 24A), bien qu'il soit difficile de conclure sur cette différence seulement à partir de cette figure. Cependant, une légère diminution de la quantité de CD4 retrouvée dans les virions produits à l'aide de la protéine Vpu

Figure 24 : Analyse des particules virales produites par complémentation en *trans* du gène *vpu* provenant de divers isolats de laboratoire et primaires

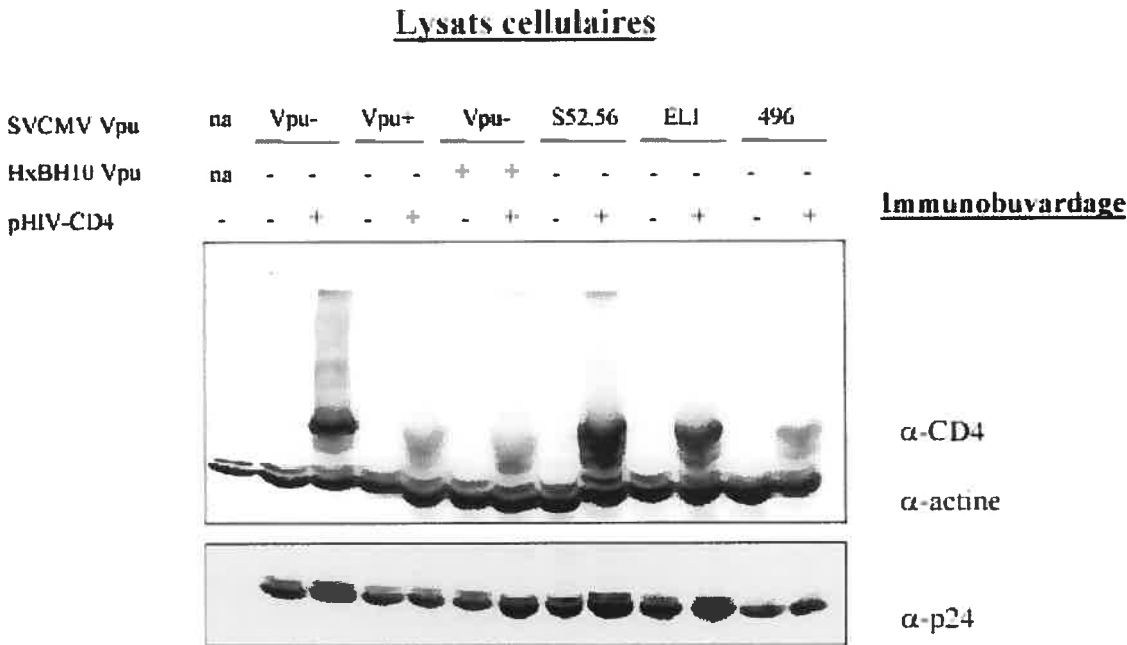
- A.** Les cellules 293T ont été co-transfectées avec la construction provirale HxBH10-Vpu⁻ ou HxBH10-Vpu⁺, une quantité fixe de pHIV-CD4 ou non et les expresseurs de Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et d'isolats primaires. Les cellules ainsi que les surnageants ont été récoltés 48 heures post-transfection. Les virions ont été concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose à partir des surnageants clarifiés, normalisés par un essai RT (20 000 cpm de RT) et lysés directement dans du tampon Leamli. Les protéines virales ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose, puis analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre le CD4 (H-370), des anticorps monoclonaux dirigés contre la p24 ou contre la gp120 (1D6).
- B.** Les cellules ayant été utilisées pour la production virale (en A) ont été lysées dans du RIPA 48 heures post-transfection. Les protéines contenues dans le lysat cellulaire ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre le CD4 (H-370) et l'actine ainsi que des anticorps monoclonaux dirigés contre la p24.
- C.** Une analyse quantitative par densitométrie a été effectuée afin de déterminer le ratio entre la quantité de gp120 totale et la quantité de p24 totale contenues dans les particules virales. Les protéines séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées par immunobuvardage ont été quantifiées à l'aide d'un densitomètre. La densité des bandes correspondant à la gp120 totale ainsi qu'à la p24 totale a été mesurée à partir de l'autoradiogramme. Le ratio gp120 totale sur p24 total a été calculé en divisant la quantité de gp120 totale par la quantité de p24 totale.



A.

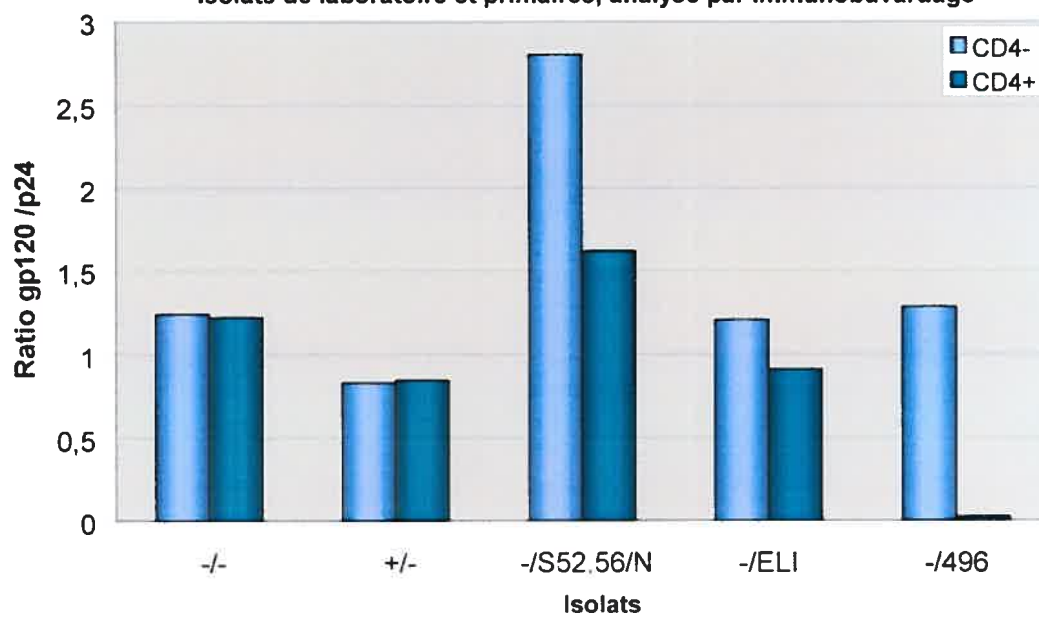


B.



C.

Ratio entre la gp120 et la p24 contenues dans les particules virales produites par complémentation en *trans* de Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et primaires, analysé par immunobuvardage



provenant de l'isolat primaire ELI a pu être calculée à partir d'une analyse densitométrique (0,6 fois moins de CD4 pour l'isolat ELI que pour l'isolat Vpu⁺, données non-montrées). D'autre part, cette diminution du niveau de CD4 incorporé dans ces virions est beaucoup moins importante que celle obtenue avec un provirus codant pour une protéine Vpu fonctionnelle, pour une quantité de virus similaire (p24) (figure 24A). Ces résultats, ainsi que ceux obtenus à la figure 23A et 23B, suggèrent que la faible capacité de rétention de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI est en mesure de réduire légèrement la quantité de CD4 qui est incorporée dans les virions, sans toutefois être suffisante à la production de particules virales ayant un plein potentiel infectieux. De plus, l'analyse protéique des cellules 293T ayant servi à la production des virions (figure 24B) démontre une fois de plus que la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI n'est pas particulièrement efficace pour induire la dégradation du CD4. En effet, le niveau de CD4 retrouvé dans ces cellules est similaire à celui retrouvé dans les cellules qui ont été transfectées à l'aide d'un expresseur Vpu⁺ ou d'un expresseur codant pour une protéine Vpu non-fonctionnelle pour l'induction de la dégradation de CD4 (Vpu S52,56/N). Ainsi, la capacité de rétention intracellulaire du CD4 par la protéine Vpu provenant de cet isolat primaire n'est pas suffisante pour permettre la production de particules virales ayant un plein potentiel infectieux. Étonnamment, l'analyse de la composition protéique des particules virales produites en présence de l'expresseur codant pour la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 montre un niveau d'incorporation du CD4 inférieur à celui retrouvé dans les particules virales produites avec un provirus Vpu⁺ et l'analyse des lysats cellulaires montre nettement un faible taux de CD4 dans ces cellules (figures 24A et 24B). Pourtant, nous avons montré précédemment que la protéine Vpu provenant de cet isolat a un défaut important en ce qui concerne sa capacité à induire la dégradation du CD4 (figures 19A et 19B). Ainsi, il semblerait qu'il y ait dégradation du CD4 dans les cellules ayant été transfectées avec un expresseur codant pour la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496, mais cette dégradation ne serait pas induite par Vpu en soi et ne se ferait pas au niveau du RE, étant donné que les cinétiques de dégradation du CD4 effectuées précédemment en présence de BFA montraient clairement un faible taux de dégradation du CD4 pour ce variant. De plus, l'infectivité des particules virales ainsi produites est comparable à celle des virions produits en absence de Vpu (figures 23A et 23B). Cependant, il est intéressant de noter que pour cet isolat, la quantité d'enveloppe retrouvée dans les virions lorsque ceux-ci sont produits en présence de CD4 est nettement inférieure comparé aux virions produits en absence de CD4 (figure 24A). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'infectivité de ces particules virales. D'ailleurs, la figure 24C (analyse quantitative des bandes retrouvées sur l'autoradiogramme en A, effectuée par densitométrie) démontre clairement qu'il y a une diminution importante de la quantité d'enveloppe par rapport à la quantité de p24 et donc, une diminution de la quantité d'enveloppe incorporée dans les particules virales produites avec le variant de Vpu provenant de l'isolat primaire 496. Cette importante diminution de la quantité de gp120 incorporée dans les virions n'est pas retrouvée chez les autres isolats étudiés, malgré qu'il soit possible de constater une certaine diminution du ratio gp120/p24 pour le mutant Vpu

S52,56/N (figure 24C). Toutefois, ces résultats sont dérivés d'une seule expérience et devront donc être répétés afin de s'assurer de leur reproductibilité, ce qui permettra aussi d'effectuer des analyses densitométriques complètes (comparaisons avec écart type). Malgré tout, ces résultats suggèrent que la rétention intracellulaire du CD4 par la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 est en mesure de réguler négativement le CD4 exprimé à la surface cellulaire et permet ainsi de diminuer le taux d'incorporation de CD4 dans les particules virales, sans toutefois permettre la production de virions ayant un potentiel infectieux optimal. Dans le présent cas, la diminution de l'infectivité des particules virales semble être liée à une diminution du niveau d'enveloppe incorporée dans les virions.

Discussion

Le VIH-1 code pour une multitude de protéines accessoires nécessaires pour la réplication, l'infectivité et la pathogenèse du virus *in vivo*. Une de ces protéines accessoires est la protéine Vpu, retrouvée principalement chez le VIH-1 et chez quelques isolats simiens (156). Les deux fonctions biologiques les plus étudiées de la protéine Vpu sont 1) l'augmentation de la relâche des particules virales (174) et 2) l'induction de la dégradation du CD4 néo-synthétisé au niveau du RE (276) via l'utilisation du système de dégradation protéique cellulaire ubiquitine-protéasome (209, 323). Cette seconde fonction nécessite la présence de sites de phosphorylation intacts au niveau de Vpu, ce qui permet le recrutement du facteur cellulaire β -TrCP, nécessaire à la formation du complexe SCF $^{\beta$ -TrCP. Ce complexe est par la suite impliqué dans la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome cellulaire (209). La fonction de dégradation du CD4 induite par Vpu a été largement étudiée et le fait que deux autres protéines virales (Env et Nef) ont un effet sur l'expression du CD4 au niveau de la surface cellulaire laisse supposer un certain avantage sélectif pour le virus de manière *in vivo*. En effet, il a été démontré par divers groupes que la diminution de l'expression du CD4 à la surface cellulaire induite par Nef et/ou Vpu est importante pour la réplication virale, mais aussi pour permettre la production de particules virales ayant un potentiel infectieux optimal (34, 73, 181, 269). Entre autre, l'incorporation de CD4 au niveau des particules virales permet la formation de complexes entre la gp120 et le CD4 incorporé, entraînant une diminution du niveau d'enveloppe disponible pour l'initiation de l'entrée subséquente des virions dans une nouvelle cellule (190).

La protéine Vpu, de par l'induction de la dégradation du CD4 formé au niveau du RE, contribue à accroître l'infectivité des particules virales en diminuant le niveau de CD4 incorporé dans les virions. Cependant, la majorité des études portant sur le VIH-1 utilisent des isolats de laboratoire dérivés de sous-types B et la plupart des autres sous-types ont été peu étudiés depuis les débuts de la recherche sur le VIH. La fonction de dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu provenant d'isolats primaires de différents sous-types n'a pas été caractérisée outre mesure. Cependant, certains résultats préliminaires effectués au laboratoire montraient que la protéine Vpu provenant de certains isolats primaires avait un défaut de sa capacité à induire la dégradation du CD4 présent au RE, et ce malgré sa capacité à lier le CD4 et β -TrCP dans les cellules. En effet, une première expérience effectuée pour vérifier la capacité de Vpu à induire la dégradation du CD4 laissait supposer que les isolats primaires ELI et 496 avaient une plus faible capacité à induire la dégradation du CD4 (données non montrées et non-publiées de Mme Julie Binette). Ceci suggérait qu'il est possible que la protéine Vpu du VIH-1 soit en mesure de réguler négativement le CD4 à la surface des cellules de deux manières différentes, soit via l'induction de la dégradation du CD4 et/ou par un phénomène de rétention intracellulaire, afin de permettre la production de particules virales ayant un plein potentiel infectieux. Nous avons donc voulu vérifier s'il était possible que Vpu retienne intracellulairement le CD4 afin de

compenser une fonction de dégradation du CD4 inefficace et ce, soit en augmentant l'affinité et/ou l'avidité de Vpu pour le CD4 et/ou en augmentant la stabilité de la protéine en soi, ce qui permettrait de produire des virions ayant un plein potentiel infectieux.

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer que dans un système utilisant un expresseur de Vpu retenu artificiellement au niveau du RE par la BFA et en présence de CD4, nous étions en mesure d'observer un défaut au niveau de la capacité de Vpu à induire la dégradation du CD4, pour certains isolats primaires. Les autoradiogrammes obtenus suite aux marquages métaboliques du CD4 et de Vpu montrent effectivement qu'en présence de la protéine Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496, il y a une forte diminution de la dégradation de CD4 (Figure 19A et 19B). Nous avons ensuite vérifié que le défaut concernant la fonction d'induction de la dégradation du CD4 induite par Vpu n'était pas imputable à l'absence ou à une diminution de la liaison à CD4 et/ou β -TrCP, la liaison à ces deux molécules étant préalable et nécessaire à l'induction de la dégradation du CD4 induite par Vpu via l'utilisation du système ubiquitine-protéasome cellulaire (208, 209, 276). Nous avons ainsi démontré que lorsque des cellules 293T étaient co-transfectées avec des expresseurs de Vpu et de β -TrCP, l'efficacité de la liaison entre β -TrCP et Vpu, provenant des isolats primaires qui sont incapables d'induire correctement la dégradation du CD4, était similaire à celle de l'isolat de laboratoire DTE Δ VEMG. Dans le même contexte, l'efficacité de liaison de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 à CD4 s'est avérée être comparable à celle de l'isolat de laboratoire DTE Δ VEMG. Également, l'efficacité de la liaison entre la protéine Vpu ELI et CD4 était altérée au même niveau qu'un mutant Vpu S52,56/N (Figure 20A-D). Étant donné l'anticorps anti-Vpu utilisé (R21S), ces expériences n'ont pu permettre la quantification précise des pourcentages de liaison des protéines Vpu provenant d'isolats primaires à CD4 ou à β -TrCP. Toutefois, nous avons tout de même pu démontrer que le défaut au niveau de la capacité de Vpu à induire la dégradation de CD4 par la protéine Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496 n'est pas causé par une diminution importante de l'affinité et/ou de l'avidité de Vpu pour les molécules CD4 et/ou β -TrCP.

Par la suite, nous avons mis au point un système de détection du CD4 total et de surface par FACS qui nous a permis de démontrer que la protéine Vpu provenant des isolats primaires ayant un défaut au niveau de l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu était en mesure de retenir le CD4 de manière intracellulaire, à différents niveaux (Figure 21A et 21B). Ces résultats suggèrent que Vpu est en mesure de palier à un défaut de sa capacité à induire la dégradation du CD4 en utilisant une seconde voie permettant de réguler négativement le CD4 à la surface cellulaire. Cette seconde voie se réaliserait via la rétention du CD4 intracellulairement, et pourrait s'accomplir suite à une augmentation de la stabilité de la protéine et/ou par une augmentation de l'affinité et/ou de l'avidité de Vpu pour le CD4. En effet, étant donné que nous n'avons pu quantifier avec exactitude le pourcentage de liaison de Vpu à CD4 pour ces variants,

il nous est impossible d'exclure qu'une augmentation de l'affinité et/ou de l'avidité de Vpu pour le CD4 ne soit pas impliquée dans le processus de rétention intracellulaire du CD4. Nous avons également montré que dans un contexte où Vpu est libre de transiter normalement dans des cellules 293T, c'est-à-dire en absence de BFA, les formes non-phosphorylées de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 sont plus stables que celles provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (Figures 22A et 22B). Ceci laisse croire que l'augmentation de la stabilité de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 pourrait être responsable du phénomène de rétention intracellulaire du CD4 chez cet isolat. Cependant cette expérience ne nous a pas permis de démontrer clairement qu'il y a une augmentation de la stabilité de toutes les formes de Vpu (phosphorylées ou non) retrouvées dans la cellule. De plus, ce même système n'a pas permis de vérifier la stabilité de la protéine Vpu provenant de l'autre isolat primaire ayant un défaut au niveau de sa capacité à induire la dégradation du CD4, soit l'isolat ELI. Toutefois, le faible signal obtenu ne semblait pas démontrer une augmentation de la stabilité de cette protéine. Cette expérience devra donc être répétée en utilisant plutôt l'anticorps 4H₁₀LC, qui permet la reconnaissance de toutes les formes de Vpu (phosphorylées et non-phosphorylées), étant donné que la séquence reconnue par cet anticorps est identique tant pour l'isolat primaire ELI que pour l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (voir figure 17).

Afin de déterminer si la capacité de rétention intracellulaire du CD4 par la protéine Vpu provenant des variants ELI et 496 était en mesure de moduler positivement l'infectivité des particules virales, nous avons co-transfecté des cellules 293T avec des constructions provirales HxBH10-Vpu^{+/+} ainsi qu'avec des expresseurs codant soit pour Vpu provenant des variants des isolats de laboratoire ou des isolats primaires ELI et 496 et/ou pour CD4. Ainsi, ce système nous a permis de compléter en *trans* la protéine Vpu qui était absente de la construction provirale et de vérifier l'impact de l'effet de rétention intracellulaire du CD4 par ces variants sur l'infectivité des particules virales relâchées. En effet, si les protéines Vpu ayant un défaut au niveau de leur capacité à induire la dégradation du CD4 paient à ce problème en retenant le CD4 à l'intérieur de la cellule, et étant donné l'importance de la régulation négative pour l'infectivité des particules virales, nous nous attendions à ce que ce second mécanisme de régulation négative du CD4 permette la formation de particules virales ayant un plein potentiel infectieux. Toutefois, nous avons montré que les particules virales ayant été produites par ce système avec les protéines Vpu provenant de variants défectifs pour la fonction de dégradation du CD4 n'étaient pas aussi infectieuses que leurs homologues produites avec un variant codant pour une protéine Vpu fonctionnelle. De plus, l'infectivité de ces particules virales était plutôt comparable à celle des particules virales produites en absence de Vpu (Figures 23A et 23B).

Étant donné qu'il est connu que l'incorporation du CD4 dans les particules virales entraîne une diminution de leur infectivité (34, 73, 181, 269), nous avons procédé à l'analyse protéique des virions. Les résultats obtenus indiquent que pour ce qui est de la protéine Vpu provenant de

l'isolat primaire ELI, l'incorporation d'une grande quantité de CD4 dans les particules virales pourrait être responsable du faible potentiel infectieux de ces particules virales (Figures 24A et 24B). Cependant, nous avons montré que le niveau de CD4 incorporé dans les particules virales produites en présence de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 ne pouvait expliquer la faible infectivité des virions, puisque ce niveau était similaire et même légèrement inférieur à celui retrouvé chez des virions ayant été produits en présence d'un Vpu fonctionnel pour l'induction de la dégradation du CD4 (Figures 24A et 24B). Toutefois, nous avons montré que ces particules virales présentent une autre particularité pouvant expliquer une diminution de l'infectivité, soit une diminution de l'incorporation de la glycoprotéine de l'enveloppe. Nous pouvons donc affirmer que malgré que certains variants de Vpu puissent palier à un défaut de leur capacité à induire la dégradation du CD4 en retenant intracellulairement le CD4, ce mécanisme de régulation négative du CD4 est incapable de mener à la production de particules virales pleinement infectieuses.

Détection de la protéine Vpu

Tout d'abord, nous voulions nous assurer que dans le contexte où nous utilisions les cellules 293T transfectées avec des expresseurs codant pour la protéine Vpu provenant de divers isolats de laboratoire et primaires, nous avions une même quantité de protéine Vpu retrouvée au niveau du RE. Cependant, à la suite des expériences de marquage métabolique de la protéine Vpu, nous n'avons pu nous assurer que la quantité de Vpu visualisée par autoradiographie était vraiment la même pour tous les échantillons étudiés, mais il s'agirait plutôt d'une quantité de protéines détectée de façon similaire. En effet, pour cette étude, nous ne pouvions utiliser l'anticorps anti-Vpu couramment utilisé au laboratoire, soit le 4H₁₀LC, étant donné que celui-ci cible la portion C-terminale de la protéine et que cette région est très peu conservée chez la plupart des isolats primaires. Pour tenter de quantifier le niveau de protéines Vpu retrouvée dans le RE à un moment donné, nous avons dû utiliser un anticorps qui reconnaît une région plus conservée, de manière à diminuer les différences dues à la reconnaissance d'épitopes. Ainsi, nous avons utilisé un anticorps qui cible en partie la région du dodécapeptide comprenant les deux résidus sérines en position 52 et 56 et qui est une région hautement conservée de la protéine Vpu (R21S). Toutefois, étant donné que le peptide utilisé pour produire cet anticorps n'était pas phosphorylé, il est impossible de reconnaître les formes phosphorylées de la protéine Vpu avec l'anti-Vpu R21S, ce qui introduit un autre biais. Cependant, des données obtenues précédemment au laboratoire suggèrent que 50% des protéines Vpu sont retrouvées sous une forme non-phosphorylée. Dans ces conditions, il nous est néanmoins impossible d'exclure que la protéine Vpu provenant de certains isolats primaires n'est pas retrouvée majoritairement sous une forme non-phosphorylée comparativement à une autre. Nous pouvons seulement dire que nous avons essayé de transfecter une quantité d'ADN permettant d'obtenir un équivalent de protéines détectées par l'anticorps anti-Vpu R21S, lorsque comparé à un isolat de laboratoire. De plus, l'absence d'un anticorps anti-Vpu permettant la détection de toutes les formes de Vpu

(phosphorylées et non-phosphorylées) à un même niveau a fait en sorte que nous n'avons pu quantifier avec exactitude les pourcentages de liaison de Vpu à CD4 ainsi qu'à β -TrCP, nous empêchant par le fait même d'éclaircir par quel mécanisme moléculaire Vpu est en mesure de retenir le CD4 intracellulairement. Effectivement, une quantification précise de la liaison de Vpu à CD4 aurait permis d'affirmer ou d'infirmer qu'une augmentation de l'affinité et/ou l'avidité de Vpu pour le CD4 est responsable du phénomène de rétention intracellulaire du CD4 par la protéine Vpu provenant d'isolats primaires ayant un défaut au niveau de leur capacité à induire la dégradation du CD4.

Il est à noter qu'il n'existe aucun anticorps commercial dirigé contre la protéine Vpu et qu'il est extrêmement difficile d'obtenir un anticorps ciblant une région hautement conservée qui permet la reconnaissance tant des formes phosphorylées que les formes non-phosphorylées. Ceci est dû au fait que 1) Vpu comporte plusieurs variabilités d'un sous-type à un autre et 2) la région la plus conservée de Vpu comporte 2 sites de phosphorylation. Afin de palier à ce problème, la meilleure solution aurait été de faire une fusion entre la portion C-terminale de Vpu et une protéine rapporteuse, comme la protéine EGFP (« enhanced green fluorescent protein »). En effet, le groupe de Stephens et ses collaborateurs a déjà démontré qu'une telle fusion n'altérerait pas la fonction de dégradation du CD4 induite par Vpu (240, 292). Ainsi, nous aurions pu nous assurer que le niveau de protéine Vpu exprimée est le même pour tous les isolats primaires, étant donné que la détection de la protéine de fusion aurait été effectuée avec un anticorps qui ciblerait plutôt la protéine fusionnée à Vpu, ici l'EGFP.

Mécanisme moléculaire de la rétention intracellulaire du CD4 par Vpu

Il est connu que l'interaction entre la portion C-terminale de Vpu et la queue cytoplasmique du CD4 est nécessaire, mais insuffisante pour induire la dégradation du CD4 par Vpu (208, 280). Néanmoins, la liaison de Vpu au CD4 constitue en soi un mécanisme de rétention. Nous avons donc tenté de démontrer qu'afin de remédier à un défaut au niveau de la capacité de Vpu à induire la dégradation du CD4 et dans le but de permettre une certaine régulation négative du CD4 exprimé à la surface cellulaire, il pourrait y avoir soit une augmentation de l'affinité et/ou l'avidité de Vpu pour le CD4 et/ou une augmentation de Vpu en soi. En effet, si Vpu est en mesure de lier plus fortement le CD4, celui-ci serait retenu par Vpu soit au niveau du RE, soit dans d'autres compartiments intracellulaires par lesquels Vpu transite normalement. Enfin, si la protéine Vpu est plus stable dans le temps, cela permettrait aussi de retenir une grande quantité de CD4 intracellulairement, étant donné qu'il y aurait une accumulation de Vpu capable de lier CD4 à un même moment. Cependant, les résultats présentés à la figure 20 ne permettent pas de démontrer clairement une augmentation de l'affinité et/ou de l'avidité de la protéine Vpu pour le CD4, chez les isolats primaires ayant un défaut de leur capacité à induire la dégradation du CD4. Comme il a été mentionné précédemment, l'utilisation d'un anticorps ne reconnaissant que les formes non-phosphorylées de Vpu ne permet pas de quantifier avec précision les

pourcentages de liaison de Vpu à CD4. En effet, il est impossible d'inclure dans les calculs de pourcentage de liaison les formes phosphorylées de Vpu ne se liant pas à CD4, celles-ci n'étant pas reconnues par l'anticorps dirigé contre Vpu. Il nous est donc impossible d'affirmer ou d'infirmer qu'une plus grande affinité et/ou avidité de la protéine Vpu pour le CD4 est responsable du phénomène de rétention intracellulaire du CD4 par Vpu chez ces isolats primaires. Toutefois, ces résultats ont permis d'exclure la possibilité que le défaut de l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu soit dû à un manque de liaison à CD4 et/ou à l'absence du recrutement de β -TrCP. En effet, malgré le fait que nous avons observé une certaine diminution de l'affinité de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI pour le CD4, les molécules CD4 qui s'y lient devraient être en mesure d'être dégradées, suite au recrutement du système ubiquitine-protéasome cellulaire. En effet, puisque Vpu provenant de l'isolat primaire ELI recrute β -TrCP à un niveau comparable à un Vpu fonctionnel pour la dégradation du CD4, nous croyons que le pourcentage de CD4 lié par ce Vpu devrait être dégradé. Toutefois, ceci ne semble pas être le cas. D'autre part, des résultats obtenus précédemment avec l'anticorps 4H₁₀LC, qui reconnaît la portion C-terminale de toutes les formes de Vpu, montraient que cet isolat lie aussi bien le CD4 que l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG. Étant donné que la portion C-terminale de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire ELI est identique à celle retrouvée chez l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (figure 17), il est possible d'exclure que l'incapacité à induire la dégradation de CD4 par ce variant de Vpu soit due à une diminution de l'affinité et/ou avidité pour le CD4.

Les résultats présentés à la figure 22 démontrent que les formes non-phosphorylées de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 sont beaucoup plus stables dans le temps que celles de la protéine Vpu provenant de l'isolat de laboratoire DTEΔVEMG (demi-vie de plus de 10 heures vs 1 heure 30 minutes respectivement). Cependant, nous n'avons pu démontrer que la protéine Vpu provenant du variant ELI était aussi empreinte à une augmentation de sa demi-vie. Le faible signal obtenu sur l'autoradiogramme ne semblait pas démontrer une augmentation de la stabilité de la protéine Vpu provenant de ce variant, mais des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer clairement la demi-vie de Vpu provenant de ce variant. Il serait en effet possible, étant donné que la région C-terminale de la protéine Vpu provenant de ce variant est identique à celle de la protéine de type sauvage, d'utiliser l'anticorps ciblant cette région plutôt que l'anti-Vpu R21S. En ce qui concerne l'isolat primaire 496, l'augmentation de la stabilité de la protéine Vpu provenant de cet isolat nous laisse croire que cette augmentation joue un rôle important dans le phénomène de rétention intracellulaire du CD4 par ce variant. Effectivement, une aussi longue demi-vie des formes non-phosphorylées laisse supposer qu'une grande quantité de la protéine Vpu restera dans la cellule infectée pendant un laps de temps important, permettant ainsi de retenir le CD4 intracellulairement via sa liaison à Vpu. Malgré que nous ne soyons pas en mesure d'affirmer que la totalité des protéines Vpu produites dans la cellule infectée subissent une augmentation de leur stabilité, nous croyons fortement qu'étant

donné la grande quantité de protéines non-phosphorylées détectées ainsi que l'importante augmentation de la demi-vie de celles-ci, ces formes pourraient être responsables à elles seules de la régulation négative du CD4 à la surface cellulaire observée par FACS. De plus, l'analyse de la séquence de la protéine Vpu pour cet isolat (figure 17) ainsi que des résultats obtenus avec certains mutants au laboratoire laissent supposer que des mutations au niveau des acides aminés retrouvées entre les positions 30 et 38 pourraient être responsables de l'augmentation de la stabilité de la protéine. En fait, il serait possible que cette région contienne un signal de transport ou encore qu'il s'agisse d'une région charnière pour la conformation de Vpu. Des mutations à ce niveau pourraient entraîner soit un masquage du signal ou encore un changement de la conformation de la protéine entraînant une augmentation de la stabilité de Vpu. Ainsi, il serait possible que certaines mutations compensatoires puissent se produire dans le but de compenser une faible capacité de Vpu à induire la dégradation du CD4, en favorisant une augmentation de la stabilité de la protéine, permettant ainsi de retenir le CD4 à l'intérieur de la cellule.

En ce qui concerne le mécanisme moléculaire de rétention de la molécule CD4 par Vpu, d'autres expériences seront nécessaires afin de démontrer hors de tout doute l'implication de l'augmentation de la stabilité de la protéine. Dans un premier temps, il serait intéressant de muter les lysines retrouvées en position 30 et 36 de la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496 pour des arginines, individuellement ou en pair, puisqu'il s'agit des acides aminés normalement retrouvés chez le type sauvage. Ceci nous permettrait ensuite de vérifier si ces mutants ont une demi-vie comparable à la protéine Vpu de type sauvage. Si c'est le cas, il pourrait être très intéressant de voir si ces mutants conservent leur capacité à retenir le CD4 intracellulairement. Plusieurs mutants ayant des mutations au niveau des deux hélices α ont été construits au laboratoire. Il pourrait être intéressant d'utiliser ces mutants afin de cibler les régions importantes pour la rétention du CD4 par Vpu. Afin d'éviter les problèmes de reconnaissance d'épitopes non-conservés, il serait essentiel d'effectuer, comme mentionné ci-haut, des fusions entre la portion C-terminale de Vpu et la protéine EGFP. Ainsi, toutes les protéines Vpu étudiées pourraient être exprimées et détectées à des niveaux comparables. De plus, ces protéines de fusion nous permettraient d'évaluer avec exactitude le niveau d'affinité et/ou d'avidité des protéines Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496 pour le CD4, permettant par le fait même d'éclaircir le mécanisme moléculaire de rétention du CD4 par Vpu. Dans un autre ordre d'idée, ces protéines de fusion permettraient aussi, lors des expériences de marquage du CD4 de surface et total, révélé par FACS, de cibler uniquement les cellules doubles positives, soit les cellules CD4⁺ et Vpu⁺, éliminant ainsi un biais indésirable lors de la réalisation de cette expérience. Ainsi, il serait possible d'évaluer plus précisément le niveau de CD4 retrouvé intracellulairement et à la surface des cellules positives pour Vpu, sans avoir à tenir compte des niveaux de CD4 des cellules n'ayant pas été co-transfectées avec Vpu.

Implication du processus de rétention intracellulaire du CD4 par Vpu pour l'infectivité des particules virales

Trois protéines virales assurent la régulation négative du CD4 exprimé à la surface cellulaire. Tôt dans l'infection, la protéine Nef interagit avec le CD4 déjà retrouvé à la surface cellulaire et induit son internalisation et sa dégradation subséquente au niveau des lysosomes. Le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe (gp160) est impliqué dans la rétention du CD4 néo-synthétisé au niveau du RE, tandis que Vpu induit la dégradation du CD4 néo-synthétisé dans le RE (323). Cette convergence de fonctions laisse croire à d'importants avantages sélectifs *in vivo*. En effet, de nombreuses études ont montré qu'en absence de régulation négative du CD4 par Nef et/ou Vpu, il y a une diminution de la réplication et de la relâche virale (269), une augmentation de l'incorporation de CD4 dans les particules virales et une diminution de l'infectivité des virions (181, 190). Ceci suggère que si une protéine Vpu déficiente pour l'induction de la dégradation du CD4 avait un second mécanisme permettant de retenir le CD4 intracellulairement, afin d'arriver à réguler négativement l'expression du CD4 à la surface cellulaire, ce mécanisme serait aussi impliqué dans la modulation positive de l'infectivité des particules virales relâchées. Cependant, les résultats que nous avons présentés à la figure 23 démontrent clairement que les particules virales, ayant été produites par complémentation en *trans* à l'aide de la protéine Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496, ne sont pas plus infectieuses que les particules virales produites en présence d'une protéine Vpu de type sauvage, à faible multiplicité d'infection (2 cpm/cellule). D'ailleurs, ces particules virales ont un potentiel infectieux comparable à celui des virions produits en absence de Vpu. Ainsi, les résultats présentés à la figure 23 démontrent que la capacité de rétention intracellulaire du CD4 des variants de Vpu incapables d'induire correctement la dégradation du CD4, n'est pas en mesure de produire des particules virales ayant un plein potentiel infectieux, infirmant ainsi notre hypothèse de départ. Cependant, ces expériences doivent être reconfirmées en utilisant de plus faibles quantités de l'expresseur de CD4, afin de prévenir les différences observées au niveau de l'infectivité des particules virales produites par complémentation en *trans* à l'aide d'une protéine Vpu de type sauvage (Figures 23A et 23B). En effet, certaines observations personnelles sur les niveaux d'expression de la molécule CD4 obtenus pour une même quantité d'ADN transfectée montraient que le plasmide pHIV-CD4 permettait d'obtenir de plus hauts taux de CD4 exprimé que le plasmide SVCMV-CD4 utilisé précédemment. Il aurait donc fallu utiliser une plus petite quantité d'ADN afin qu'une protéine Vpu fonctionnelle pour l'induction de la dégradation de CD4 ne soit pas surchargée par une trop grande quantité de CD4 produit dans la cellule. La diminution de la quantité de CD4 transfectée nous permettra aussi de mieux évaluer la perte d'infectivité des particules virales ayant été produites par complémentation en *trans* avec la protéine Vpu provenant des isolats primaires.

Toutefois, les résultats présentés jusqu'à maintenant tendent à infirmer notre hypothèse. La perte d'infectivité des particules virales produites par complémentation en *trans* de la protéine

Vpu provenant du variant ELI peut être expliqué par les résultats que nous avons obtenus suite à l'analyse protéique des particules virales. En effet, les résultats obtenus à la figure 24A démontrent qu'une quantité importante de CD4 est incorporée dans les virions produits en présence de la protéine Vpu ELI, malgré que celle-ci soit en mesure de retenir de manière intermédiaire le CD4 intracellulairement (Figures 21A-B et 24A). En fait, il est possible que malgré le fait que la protéine Vpu provenant de ce variant soit en mesure de retenir le CD4 de manière intracellulaire, les compartiments cellulaires dans lesquels sont retenus le CD4 par Vpu pourraient aussi être un lieu où certaines protéines du VIH-1 se retrouvent lors de la réplication et de l'assemblage. Ainsi, par interaction entre les protéines du VIH-1 dans ces compartiments et le CD4, celui-ci pourrait être incorporé dans les virions et alors affecter leur infectivité. Les expériences effectuées lors de cette étude n'avaient pas pour but d'identifier les compartiments intracellulaires où étaient retenues les molécules de CD4. Cependant, il pourrait être grandement intéressant, à l'aide des anticorps appropriés ainsi qu'avec des constructions où la portion C-terminale de la protéine Vpu provenant des isolats primaires ELI et 496 serait fusionnée à la EGFP, d'effectuer des expériences de localisation par immunofluorescence de ces protéines en absence et en présence de CD4. Ainsi, nous pourrions déterminer, à l'aide de divers marqueurs cellulaires (ex : CD63, TGN-46, LAMP-1, etc.), dans quels types de compartiments cellulaires les protéines CD4 sont retenues par les protéines Vpu provenant de ces isolats primaires. Si les protéines Vpu provenant des variants ELI et 496 retiennent le CD4 dans des compartiments cellulaires impliqués dans la réplication et/ou le l'assemblage viral, nous devrions alors observer une colocalisation des complexes Vpu-CD4 avec différents marqueurs cellulaires de ces compartiments (par exemple si le complexe Vpu-CD4 se retrouve aux MVBs, il devrait y avoir colocalisation avec les marqueurs cellulaires LAMP-1, CD63 et HLA-DR) (260).

Les résultats que nous avons présentés à la figure 23 démontraient que la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496, lorsque complémentée en *trans*, ne permet pas de produire des particules virales pleinement infectieuses et ce, malgré sa capacité de retenir le CD4 intracellulairement. De manière intéressante, l'analyse protéique des particules virales ainsi produites ne montraient pas une accumulation importante de CD4 dans les particules virales, mais plutôt un niveau de CD4 incorporé inférieur à celui retrouvé dans des virions ayant été produits par complémentation à l'aide d'une protéine Vpu de type sauvage (Figure 23A). Cependant, nous avons aussi montré qu'une très faible proportion de la glycoprotéine de l'enveloppe était incorporée dans les particules virales, ce qui permet d'expliquer en partie la diminution importante de l'infectivité de ces particules virales. Certaines études présentement en cours au laboratoire démontrent que Vpu est transportée dans des compartiments post-RE pour être dégradée (données non-publiées). Étant donné la diminution de CD4 et d'enveloppe incorporées dans les virions ainsi que la grande stabilité des formes non-phosphorylées de la protéine Vpu provenant du variant 496, nous croyons qu'il est possible qu'il y ait formation de complexes entre Vpu, CD4 et le précurseur de l'enveloppe gp160. Ces complexes seraient alors

retenus dans des compartiments cellulaires où Vpu est normalement transportée et ce, jusqu'à ce que Vpu ait rejoint son site de dégradation de Vpu. Par exemple, il est possible de croire qu'il pourrait s'agir des lysosomes. Ainsi, les complexes Vpu-CD4-Env pourraient être dégradés, diminuant par le fait même le niveau de CD4 et d'enveloppe incorporés dans les particules virales. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer pourquoi, malgré un défaut de l'induction de la dégradation du CD4 par la protéine Vpu provenant de l'isolat primaire 496, on voit une diminution de la quantité de CD4 retrouvée dans les lysats cellulaires ayant servi à la production des virions (Figure 24B).

Toutefois, du point de vue du virus, la diminution de la quantité de glycoprotéines de l'enveloppe ne semble pas constituer un avantage sélectif, étant donné que cela entraîne aussi une diminution de l'infectivité des particules virales. Il aurait été intéressant de déterminer à quel stade de l'infection le variant 496 a été recueilli, de manière à pouvoir se prononcer davantage sur ce type de stratégie. Il pourrait être intéressant de vérifier si les particules virales ainsi produites ont, malgré un faible niveau d'enveloppe incorporée, une meilleure transmission cellule-cellule, ce qui pourrait constituer un avantage pour les particules virales retrouvées dans certains réservoirs. Il aurait aussi été intéressant de vérifier si le gène *nef* provenant de l'isolat primaire 496 a une capacité accrue d'induire l'internalisation et la dégradation du CD4 dans les lysosomes comparativement à une protéine Nef de type sauvage, ce qui pourrait pallier à un défaut de l'induction de la dégradation du CD4 par Vpu. Nous pourrions d'ailleurs analyser la contribution de chacun de ces deux gènes dans la régulation négative du CD4 exprimé à la surface des cellules ainsi que leur contribution respective à l'infectivité des particules virales relâchées, pour les isolats présentant des défauts de leur capacité à induire la dégradation du CD4 par Vpu. Ceci pourrait être effectué en produisant des provirus ayant l'un ou l'autre des gènes mutés de manière à ce qu'ils ne soient pas fonctionnels et en vérifiant l'infectivité des virions produits à l'aide de ces provirus.

Étant donné que toutes nos études ont été effectuées à partir d'expressions dans un contexte où souvent, le niveau d'expression des différentes protéines utilisées n'est pas uniforme, il serait pertinent de reproduire ces résultats non pas avec des expresssions de Vpu et de CD4, mais plutôt avec des provirus isogéniques, sauf pour le gène Vpu, dans des cellules exprimant le CD4. Ainsi, il nous serait possible de s'assurer que les effets observés dans cette étude sont aussi retrouvés dans un contexte mimant l'infection par le VIH-1, c'est-à-dire dans un contexte où le CD4 est exprimé à des niveaux comparables à celui des cellules T et où la protéine Vpu serait synthétisée à des niveaux comparables à ceux exprimés dans les cellules infectées. Pour ce faire, nous pourrions utiliser les lignées cellulaires de laboratoire de type Jurkat ou MT4, qui expriment le CD4 à des niveaux similaires à ceux des cellules lymphocytaires T.

Importance de la fonction de régulation négative du CD4

La fonction de dégradation du CD4 induite par la protéine Vpu a une incidence sur la pathogenèse virale. Tout d'abord, en absence de régulation négative du CD4 soit par Vpu et/ou Nef, il y a une diminution du nombre de particules virales relâchées (269), diminuant ainsi la probabilité d'infecter de nouvelles cellules. D'ailleurs, des individus infectés avec des souches qui ont une capacité réduite à réguler négativement le CD4 développent moins rapidement la maladie. En effet, il peut s'écouler jusqu'à 15 ans avant que ces patients atteignent la phase SIDA, même en absence de traitements anti-rétroviraux. Ainsi, une diminution du nombre de particules virales relâchées entraînerait une diminution de la propagation virale ainsi qu'une diminution du nombre de cellules nouvellement infectées. Aussi, une mauvaise régulation négative du CD4 à la surface des cellules entraîne l'incorporation de ces molécules dans les particules virales, diminuant par le fait même leur potentiel infectieux (181, 190). Encore une fois, s'il y a une diminution du nombre de particules virales produites et que celles-ci sont moins infectieuses, il y pourrait y avoir une diminution du nombre de cellules cibles infectées et les patients infectés ne progresseraient pas aussi rapidement vers les stades avancés de la maladie. D'autres part, des études réalisées avec un virus chimérique SHIV ayant un changement de cadre de lecture non fonctionnel pour la protéine Vpu démontrent que le virus acquière certaines mutations compensatoires au niveau des gènes *nef* et *env*, suggérant fortement l'importance d'une fonction de régulation négative du CD4 dans la pathogenèse (293). De plus, l'utilisation d'un virus chimérique SHIV ayant des mutations au niveau des sites de phosphorylation en position 52 et 56 de Vpu démontre un retard de la progression de la maladie chez les singes infectés, suggérant l'importance de la fonction de dégradation du CD4 induite par Vpu dans la pathogenèse virale de manière *in vivo* (292).

Conclusions

En résumé, nos résultats démontrent pour la première fois qu'il existe deux voies possibles de régulation négative du CD4 à la surface cellulaire induite par la protéine Vpu, soit suite à l'induction de la dégradation du CD4 et/ou par un phénomène de rétention intracellulaire du CD4. Cependant, nos résultats n'ont pu démontrer clairement par quels mécanismes la rétention du CD4 de manière intracellulaire par Vpu se produisait. D'autres expériences utilisant des protéines de fusion entre le domaine C-terminal de Vpu et l'EGFP doivent être effectuées afin de déterminer l'implication d'une augmentation de l'affinité et/ou avidité pour le CD4 des protéines Vpu provenant d'isolats primaires qui retiennent intracellulairement le CD4, mais qui sont incapables d'induire correctement la dégradation du CD4. Nous n'avons pas été en mesure de démontrer hors de tout doute si cette capacité de rétention intracellulaire du CD4 par ces variants de Vpu impliquait une augmentation de la stabilité de la protéine. Ces mêmes constructions permettront alors de déterminer si le phénomène de rétention intracellulaire du CD4 nécessite une augmentation de la stabilité de la protéine Vpu en soi. Ces expériences nous permettraient de mieux caractériser le mécanisme par lequel Vpu retient le CD4 à l'intérieur des cellules. Les résultats obtenus suite à la production de particules virales par complémentation *in trans* de la protéine Vpu provenant d'isolats primaires ayant une capacité de rétention intracellulaire du CD4, ainsi qu'un défaut de sa capacité à induire la dégradation du CD4, démontrent que le mécanisme de rétention du CD4 à l'intérieur de la cellule ne permet pas de produire des particules virales totalement infectieuses. Les résultats obtenus suite à l'analyse protéique des particules virales suggèrent que les complexes formés entre Vpu et CD4 vont transiter vers des compartiments cellulaires où 1) ils rencontreront d'autres protéines virales permettant une interaction avec le CD4 qui sera incorporé ou 2) seront dégradés dans des compartiments cellulaires où la dégradation de Vpu s'effectue normalement. Des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de confirmer ces hypothèses. De plus, nous voudrions vérifier si ces résultats sont reproductibles dans un contexte plus représentatif de l'infection *in vivo*, c'est-à-dire où Vpu serait exprimée à partir d'un provirus dans des cellules exprimant le CD4 à des niveaux comparables à celui des cellules lymphocytaires T. Étant donné l'importance de la fonction de régulation négative du CD4 exprimé à la surface cellulaire dans la pathogenèse *in vivo*, des connaissances permettant de mieux comprendre les mécanismes viraux visant à palier à un défaut de cette fonction permettraient probablement de développer de nouvelles stratégies pour contrôler les infections au VIH-1.

Références bibliographiques

1. 1993. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Jama* **269**:729-30.
2. 1982. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:652-4.
3. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:507-8, 513-4.
4. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**:644-6, 652.
5. **Accola, M. A., A. A. Bukovsky, M. S. Jones, and H. G. Gottlinger.** 1999. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agg). *J Virol* **73**:9992-9.
6. **Accola, M. A., B. Strack, and H. G. Gottlinger.** 2000. Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J Virol* **74**:5395-402.
7. **Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**:284-91.
8. **Aiken, C.** 1997. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* **71**:5871-7.
9. **Aiken, C., and D. Trono.** 1995. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol* **69**:5048-56.
10. **Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi, and K. Strebel.** 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* **194**:1299-311.
11. **Albert, J., B. Abrahamsson, K. Nagy, E. Aurelius, H. Gaines, G. Nystrom, and E. M. Fenyo.** 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *Aids* **4**:107-12.
12. **Alberts, B. J., Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter.** 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York and London: Garland Science.
13. **Alee, T. M., and W. Popik.** 2004. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* **279**:34083-6.
14. **Aloia, R. C., F. C. Jensen, C. C. Curtain, P. W. Mobley, and L. M. Gordon.** 1988. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:900-4.
15. **Altfeld, M., E. S. Rosenberg, R. Shankarappa, J. S. Mukherjee, F. M. Hecht, R. L. Eldridge, M. M. Addo, S. H. Poon, M. N. Phillips, G. K. Robbins, P. E. Sax, S. Boswell, J. O. Kahn, C. Brander, P. J. Goulder, J. A. Levy, J. I. Mullins, and B. D. Walker.** 2001. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* **193**:169-80.

16. **Arendrup, M., C. Nielsen, J. E. Hansen, C. Pedersen, L. Mathiesen, and J. O. Nielsen.** 1992. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5:303-7.
17. **Arganaraz, E. R., M. Schindler, F. Kirchhoff, M. J. Cortes, and J. Lama.** 2003. Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *J Biol Chem* 278:33912-9.
18. **Arold, S. T., and A. S. Baur.** 2001. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci* 26:356-63.
19. **Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. Sowder, 2nd, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258:1935-8.
20. **Asante-Appiah, E., and A. M. Skalka.** 1997. Molecular mechanisms in retrovirus DNA integration. *Antiviral Res* 36:139-56.
21. **Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr.** 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J* 16:1820-31.
22. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
23. **Bathurst, I. C., N. Chester, H. L. Gibson, A. F. Dennis, K. S. Steimer, and P. J. Barr.** 1989. N myristylation of the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 63:3176-9.
24. **Bennett, R. P., T. D. Nelle, and J. W. Wills.** 1993. Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus gag proteins. *J Virol* 67:6487-98.
25. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
26. **Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang.** 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-82.
27. **Besnard-Guerin, C., N. Belaidouni, I. Lassot, E. Segéral, A. Jobart, C. Marchal, and R. Benarous.** 2004. HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates. *J Biol Chem* 279:788-95.
28. **Blot, G., K. Janvier, S. Le Panse, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2003. Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. *J Virol* 77:6931-45.
29. **Bongertz, V., M. G. Morgado, B. Galvao-Castro, H. Wigzell, and R. M. Hendry.** 1994. Correlation between anti-V3 peptide and neutralizing antibodies in plasma from HIV-1 infected individuals resident in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:113-4.
30. **Borsetti, A., A. Ohagen, and H. G. Gottlinger.** 1998. The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J Virol* 72:9313-7.
31. **Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen.** 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in

- genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* **3**:1151-7.
32. **Bour, S., R. Geleziunas, and M. A. Wainberg.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* **59**:63-93.
 33. **Bour, S., C. Perrin, H. Akari, and K. Strebel.** 2001. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *J Biol Chem* **276**:15920-8.
 34. **Bour, S., C. Perrin, and K. Strebel.** 1999. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem* **274**:33800-6.
 35. **Bour, S., U. Schubert, K. Peden, and K. Strebel.** 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**:820-9.
 36. **Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol* **69**:1510-20.
 37. **Bour, S., and K. Strebel.** 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**:1029-39.
 38. **Bour, S., and K. Strebel.** 2000. HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system. *Adv Pharmacol* **48**:75-120.
 39. **Bour, S., and K. Strebel.** 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* **70**:8285-300.
 40. **Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, R. A. Fouchier, Y. Jenkins, B. E. Meyer, L. I. Wu, M. Emerman, and M. H. Malim.** 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* **7**:1025-35.
 41. **Braaten, D., E. K. Franke, and J. Luban.** 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**:3551-60.
 42. **Brenner, C., and G. Kroemer.** 2003. The mitochondriotoxic domain of Vpr determines HIV-1 virulence. *J Clin Invest* **111**:1455-7.
 43. **Brown, J. A., T. K. Howcroft, and D. S. Singer.** 1998. HIV Tat protein requirements for transactivation and repression of transcription are separable. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**:9-16.
 44. **Bukovsky, A. A., T. Dorfman, A. Weimann, and H. G. Gottlinger.** 1997. Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J Virol* **71**:1013-8.
 45. **Bukrinskaya, A., B. Brichacek, A. Mann, and M. Stevenson.** 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* **188**:2113-25.
 46. **Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-9.
 47. **Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson.** 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6580-4.
 48. **Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, and M. Stevenson.** 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6125-9.

49. **Burniston, M. T., A. Cimorelli, J. Colgan, S. P. Curtis, and J. Luban.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol* **73**:8527-40.
50. **Bushman, F. D., and R. Craigie.** 1991. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:1339-43.
51. **Callahan, M. A., M. A. Handley, Y. H. Lee, K. J. Talbot, J. W. Harper, and A. T. Panganiban.** 1998. Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *J Virol* **72**:5189-97.
52. **Camaur, D., and D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* **70**:6106-11.
53. **Campbell, E. M., R. Nunez, and T. J. Hope.** 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **78**:5745-55.
54. **Campbell, S., and A. Rein.** 1999. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J Virol* **73**:2270-9.
55. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2002. Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *Aids* **16**:2253-61.
56. **Cancio, R., S. Spadari, and G. Maga.** 2004. Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* **383**:475-82.
57. **Carl, S., T. C. Greenough, M. Krumbiegel, M. Greenberg, J. Skowronski, J. L. Sullivan, and F. Kirchhoff.** 2001. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J Virol* **75**:3657-65.
58. **Carriere, C., B. Gay, N. Chazal, N. Morin, and P. Boulanger.** 1995. Sequence requirements for encapsidation of deletion mutants and chimeras of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor into retrovirus-like particles. *J Virol* **69**:2366-77.
59. **Carroll, I. R., J. Wang, T. K. Howcroft, and D. S. Singer.** 1998. HIV Tat represses transcription of the beta 2-microglobulin promoter. *Mol Immunol* **35**:1171-8.
60. **Casella, C. R., E. L. Rapaport, and T. H. Finkel.** 1999. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing. *J Virol* **73**:92-100.
61. **Cen, S., F. Guo, M. Niu, J. Saadatmand, J. Deflassieux, and L. Kleiman.** 2004. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* **279**:33177-84.
62. **Chase, A., Y. Zhou, and R. F. Siliciano.** 2006. HIV-1-induced depletion of CD4⁺ T cells in the gut: mechanism and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* **27**:4-7.
63. **Chen, C. A., and H. Okayama.** 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**:632-8.
64. **Chowers, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwok, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli.** 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* **68**:2906-14.
65. **Cimorelli, A., and J. L. Darlix.** 2002. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* **59**:1166-84.

66. **Coady, M. J., N. G. Daniel, E. Tiganos, B. Allain, J. Friberg, J. Y. Lapointe, and E. A. Cohen.** 1998. Effects of Vpu expression on *Xenopus* oocyte membrane conductance. *Virology* **244**:39-49.
67. **Cochrane, A.** 2004. Controlling HIV-1 Rev function. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:287-95.
68. **Coffin, J. M. H., Stephen, H.; Varmus, Harold E.** 1997. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview (NY).
69. **Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* **64**:3097-9.
70. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**:532-4.
71. **Cohen, P.** 2006. Beast in the belly. A new focus on early HIV infection in the gut and other mucosal tissues may generate novel strategies to study, treat, and prevent infection. *IAVI Rep* **10**:1-5.
72. **Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**:935-44.
73. **Cortes, M. J., F. Wong-Staal, and J. Lama.** 2002. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J Biol Chem* **277**:1770-9.
74. **Courgnaud, V., B. Abela, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, S. Loul, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2003. Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *J Virol* **77**:12523-34.
75. **Courgnaud, V., M. Salemi, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, B. Abela, P. Auzel, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**:8298-309.
76. **Crise, B., L. Buonocore, and J. K. Rose.** 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol* **64**:5585-93.
77. **Daar, E. S., T. Moudgil, R. D. Meyer, and D. D. Ho.** 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**:961-4.
78. **Dagleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
79. **Das, S. R., and S. Jameel.** 2005. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res* **121**:315-32.
80. **Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine.** 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-7.
81. **de Noronha, C. M., M. P. Sherman, H. W. Lin, M. V. Cavois, R. D. Moir, R. D. Goldman, and W. C. Greene.** 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* **294**:1105-8.
82. **Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Dowton, and J. Mills.** 1995. Genomic structure of

- an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**:988-91.
83. **Debouck, C., J. G. Gorniak, J. E. Strickler, T. D. Meek, B. W. Metcalf, and M. Rosenberg.** 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8903-6.
 84. **Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze** 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113**:3365-74.
 85. **Deora, A., and L. Ratner.** 2001. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J Virol* **75**:6714-8.
 86. **Deora, A., P. Spearman, and L. Ratner.** 2000. The N-terminal matrix domain of HIV-1 Gag is sufficient but not necessary for viral protein U-mediated enhancement of particle release through a membrane-targeting mechanism. *Virology* **269**:305-12.
 87. **Derrien, M., N. Pizzato, G. Dolcini, E. Menu, G. Chaouat, F. Lenfant, F. Barre-Sinoussi, and P. L. Bouteiller.** 2004. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* **85**:1945-54.
 88. **Deshaies, R. J.** 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:435-67.
 89. **Dickey, C., U. Ziegner, M. G. Agadjanyan, V. Srikantan, Y. Refaeli, A. Prabhu, A. Sato, W. V. Williams, D. B. Weiner, and K. E. Ugen.** 2000. Murine monoclonal antibodies biologically active against the amino region of HIV-1 gp120: isolation and characterization. *DNA Cell Biol* **19**:243-52.
 90. **Doms, R. W., and S. C. Peiper.** 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* **235**:179-90.
 91. **DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos.** 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**:379-87.
 92. **Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, W. Chung, T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2005. Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding. *J Biol Chem* **280**:628-36.
 93. **Ehrlich, L. S., B. E. Agresta, and C. A. Carter.** 1992. Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J Virol* **66**:4874-83.
 94. **Elfgang, C., O. Rosorius, L. Hofer, H. Jaksche, J. Hauber, and D. Bevec.** 1999. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6229-34.
 95. **Ewart, G. D., K. Mills, G. B. Cox, and P. W. Gage.** 2002. Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur Biophys J* **31**:26-35.
 96. **Ewart, G. D., T. Sutherland, P. W. Gage, and G. B. Cox.** 1996. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* **70**:7108-15.
 97. **Fan, L., and K. Peden.** 1992. Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1. *Virology* **190**:19-29.
 98. **Fassati, A., and S. P. Goff.** 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**:3626-35.

99. **Finken-Eigen, M., R. A. Rohricht, and K. Kohrer.** 1997. The VPS4 gene is involved in protein transport out of a yeast pre-vacuolar endosome-like compartment. *Curr Genet* 31:469-80.
100. **Finzi, A., A. Brunet, Y. Xiao, J. Thibodeau, and E. A. Cohen.** 2006. Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *J Virol* 80:9789-97.
101. **Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al.** 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320:367-71.
102. **Flint, S. J. E., L.W.; Krug, R.M.; Racanniello, V.R.; Skalka, A.M.** 2000. *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis ant Control.* ASM Press, Washington, D.C.
103. **Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90:1051-60.
104. **Fouchier, R. A., B. E. Meyer, J. H. Simon, U. Fischer, A. V. Albright, F. Gonzalez-Scarano, and M. H. Malim.** 1998. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* 72:6004-13.
105. **Franke, E. K., H. E. Yuan, K. L. Bossolt, S. P. Goff, and J. Luban.** 1994. Specificity and sequence requirements for interactions between various retroviral Gag proteins. *J Virol* 68:5300-5.
106. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372:359-62.
107. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1-15.
108. **Freed, E. O.** 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26:13-33.
109. **Freed, E. O., G. Englund, and M. A. Martin.** 1995. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol* 69:3949-54.
110. **Freed, E. O., J. M. Orenstein, A. J. Buckler-White, and M. A. Martin.** 1994. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* 68:5311-20.
111. **Friborg, J., A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1995. Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8:10-22.
112. **Fujita, K., S. Omura, and J. Silver.** 1997. Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors. *J Gen Virol* 78 (Pt 3):619-25.
113. **Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida.** 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390:308-11.
114. **Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono.** 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9825-30.
115. **Gallo, R. C.** 1988. HIV--the cause of AIDS: an overview on its biology, mechanisms of disease induction, and our attempts to control it. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1:521-35.
116. **Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-3.

117. **Garcia, J. A., F. K. Wu, R. Mitsuyasu, and R. B. Gaynor.** 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *Embo J* **6**:3761-70.
118. **Garcia, J. V., and A. D. Miller.** 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**:508-11.
119. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
120. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97.
121. **Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M. A. Koch.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.
122. **Geraghty, R. J., K. J. Talbot, M. Callahan, W. Harper, and A. T. Panganiban.** 1994. Cell type-dependence for Vpu function. *J Med Primatol* **23**:146-50.
123. **Giacca, M.** 2004. The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **4**:277-85.
124. **Goddard, C., A. Aquino, R. I. Glazer, and R. L. Felsted.** 1989. Chemical characterization of p17gag from human immunodeficiency virus as an N-terminally myristoylated protein. *Eur J Biochem* **182**:323-6.
125. **Goh, W. C., M. E. Rogel, C. M. Kinsey, S. F. Michael, P. N. Fultz, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and M. Emerman.** 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* **4**:65-71.
126. **Goila-Gaur, R., D. G. Demirov, J. M. Orenstein, A. Ono, and E. O. Freed.** 2003. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* **77**:6507-19.
127. **Gonzalez, M. E., and L. Carrasco.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 VPU protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrane permeabilization. *Virology* **279**:201-9.
128. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-31.
129. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15 Suppl 5**:S13-20.
130. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine.** 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7381-5.
131. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3195-9.
132. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.

133. **Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
134. **Greene, W. C., and B. M. Peterlin.** 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**:673-80.
135. **Grice, A. L., I. D. Kerr, and M. S. Sansom.** 1997. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett* **405**:299-304.
136. **Gummuluru, S., C. M. Kinsey, and M. Emerman.** 2000. An in vitro rapid-turnover assay for human immunodeficiency virus type 1 replication selects for cell-to-cell spread of virus. *J Virol* **74**:10882-91.
137. **Haffar, O. K., S. Popov, L. Dubrovsky, I. Agostini, H. Tang, T. Pushkarsky, S. G. Nadler, and M. Bukrinsky.** 2000. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol* **299**:359-68.
138. **Handley, M. A., S. Paddock, A. Dall, and A. T. Panganiban.** 2001. Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependant redistribution of HIV-1 Gag protein. *Virology* **291**:198-207.
139. **Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim.** 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**:803-9.
140. **Harris, R. S., S. K. Petersen-Mahrt, and M. S. Neuberger.** 2002. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* **10**:1247-53.
141. **He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan, and N. R. Landau.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**:6705-11.
142. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-5.
143. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**:2119-23.
144. **Henderson, B. R., and P. Percipalle.** 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* **274**:693-707.
145. **Henklein, P., R. Kinder, U. Schubert, and B. Bechinger.** 2000. Membrane interactions and alignment of structures within the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain: effect of phosphorylation of serines 52 and 56. *FEBS Lett* **482**:220-4.
146. **Henriet, S., D. Richer, S. Bernacchi, E. Decroly, R. Vigne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, J. C. Paillart, and R. Marquet.** 2005. Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* **354**:55-72.
147. **Heyman, T., M. Wilhelm, and F. X. Wilhelm.** 2003. The central PPT of the yeast retrotransposon Ty1 is not essential for transposition. *J Mol Biol* **331**:315-20.
148. **Hicke, L., D. R.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*:141-72.
149. **Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3099-104.

150. **Hochstrasser, M.** 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**:405-39.
151. **Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence, and D. Gabuzda.** 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **201**:349-55.
152. **Hout, D. R., L. M. Gomez, E. Pacyniak, J. M. Miller, M. S. Hill, and E. B. Stephens.** 2006. A single amino acid substitution within the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein renders simian-human immunodeficiency virus (SHIV(KU-1bMC33)) susceptible to rimantadine. *Virology* **348**:449-61.
153. **Howcroft, T. K., L. A. Palmer, J. Brown, B. Rellahan, F. Kashanchi, J. N. Brady, and D. S. Singer.** 1995. HIV Tat represses transcription through Sp1-like elements in the basal promoter. *Immunity* **3**:127-38.
154. **Hsu, K., J. Seharaseyon, P. Dong, S. Bour, and E. Marban.** 2004. Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell* **14**:259-67.
155. **Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed.** 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**:6810-8.
156. **Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson.** 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**:356-9.
157. **Iafrate, A. J., S. Carl, S. Bronson, C. Stahl-Hennig, T. Swigut, J. Skowronski, and F. Kirchhoff.** 2000. Disrupting surfaces of nef required for downregulation of CD4 and for enhancement of virion infectivity attenuates simian immunodeficiency virus replication in vivo. *J Virol* **74**:9836-44.
158. **Jabbar, M. A., and D. P. Nayak.** 1990. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J Virol* **64**:6297-304.
159. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
160. **Jacotot, E., K. F. Ferri, C. El Hamel, C. Brenner, S. Druillennec, J. Hoebeke, P. Rustin, D. Metivier, C. Lenoir, M. Geuskens, H. L. Vieira, M. Loeffler, A. S. Belzacq, J. P. Briand, N. Zamzami, L. Edelman, Z. H. Xie, J. C. Reed, B. P. Roques, and G. Kroemer.** 2001. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med* **193**:509-19.
161. **Jacotot, E., L. Ravagnan, M. Loeffler, K. F. Ferri, H. L. Vieira, N. Zamzami, P. Costantini, S. Druillennec, J. Hoebeke, J. P. Briand, T. Irinopoulou, E. Daugas, S. A. Susin, D. Cointe, Z. H. Xie, J. C. Reed, B. P. Roques, and G. Kroemer.** 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**:33-46.
162. **Jenkins, Y., P. V. Sanchez, B. E. Meyer, and M. H. Malim.** 2001. Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging. *J Virol* **75**:8348-52.
163. **Jones, H. W., Jr., V. A. McKusick, P. S. Harper, and K. D. Wu.** 1971. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* **38**:945-9.
164. **Jowett, J. B., D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones.** 1992. Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J Gen Virol* **73** (Pt 12):3079-86.

165. **Jowett, J. B., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen, and I. S. Chen.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**:6304-13.
166. **Julg, B., and F. D. Goebel.** 2005. HIV genetic diversity: any implications for drug resistance? *Infection* **33**:299-301.
167. **Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-White, and K. Strebel.** 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**:11398-407.
168. **Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr.** 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145-55.
169. **Kerkau, T., I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Hunig, A. Schimpl, and U. Schubert.** 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* **185**:1295-305.
170. **Kimpton, J., and M. Emerman.** 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol* **66**:2232-9.
171. **Kino, T., and G. N. Pavlakis.** 2004. Partner molecules of accessory protein Vpr of the human immunodeficiency virus type 1. *DNA Cell Biol* **23**:193-205.
172. **Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan, and R. C. Desrosiers.** 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* **332**:228-32.
173. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-8.
174. **Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-9.
175. **Knipe, D. M., Peter, M.; Griffin, Diane E.; et al.** 2001. *Fields Virology*, Fourth ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
176. **Komoto, S., S. Tsuji, M. S. Ibrahim, Y. G. Li, J. Warachit, K. Taniguchi, and K. Ikuta.** 2003. The vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 plays a protective role against virus-induced apoptosis in primary CD4(+) T lymphocytes. *J Virol* **77**:10304-13.
177. **Komoto, S., S. Tsuji, B. J. Lee, Y. Iwabu, Y. Kojima, T. Otake, K. Taniguchi, and K. Ikuta.** 2005. Higher frequency of premature stop codon mutations at vpu gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with those of other subtypes. *Microbes Infect* **7**:139-47.
178. **Kondo, E., and H. G. Gottlinger.** 1996. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* **70**:159-64.
179. **Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**:4650-5.
180. **Kuiken C, F. B., Hahn B, et al.** 2000. HIV sequence compendium. Los Alamos National Laboratory.
181. **Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono.** 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* **9**:622-31.
182. **Laney, J. D., and M. Hochstrasser.** 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97**:427-30.

183. **Laughlin, M. A., and R. J. Pomerantz.** 1994. Cellular latency in HIV-1 infection. *Clin Lab Med* 14:239-55.
184. **Le Rouzic, E., A. Mousnier, C. Rustum, F. Stutz, E. Hallberg, C. Dargemont, and S. Benichou.** 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* 277:45091-8.
185. **Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance.** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112.
186. **Lee, P. P., and M. L. Linial.** 1994. Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal. *J Virol* 68:6644-54.
187. **Lemmon, S. K., and L. M. Traub.** 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 12:457-66.
188. **Lenburg, M. E., and N. R. Landau.** 1993. Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* 67:7238-45.
189. **Levesque, K., A. Finzi, J. Binette, and E. A. Cohen.** 2004. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 2:51-9.
190. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem* 278:28346-53.
191. **Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman.** 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11:3053-8.
192. **Li, J., Y. Liu, I. W. Park, and J. J. He.** 2002. Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J Virol* 76:4526-35.
193. **Liang, C., J. Hu, J. B. Whitney, L. Kleiman, and M. A. Wainberg.** 2003. A structurally disordered region at the C terminus of capsid plays essential roles in multimerization and membrane binding of the gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77:1772-83.
194. **Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* 68:4857-61.
195. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *Embo J* 16:695-705.
196. **Lopez-Verges, S., G. Camus, G. Blot, R. Beauvoir, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2006. Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14947-52.
197. **Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67:6542-50.
198. **Lundquist, C. A., M. Tobiume, J. Zhou, D. Unutmaz, and C. Aiken.** 2002. Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes. *J Virol* 76:4625-33.
199. **Lusic, M., A. Marcello, A. Cereseto, and M. Giacca.** 2003. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *Embo J* 22:6550-61.
200. **Ma, C., F. M. Marassi, D. H. Jones, S. K. Straus, S. Bour, K. Strebel, U. Schubert, M. Oblatt-Montal, M. Montal, and S. J. Opella.** 2002. Expression,

- purification, and activities of full-length and truncated versions of the integral membrane protein Vpu from HIV-1. *Protein Sci* 11:546-57.
201. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-48.
 202. **Maldarelli, F., M. Y. Chen, R. L. Willey, and K. Strebel.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol* 67:5056-61.
 203. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-7.
 204. **Malim, M. H., L. S. Tiley, D. F. McCarn, J. R. Rusche, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* 60:675-83.
 205. **Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.
 206. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69:5087-94.
 207. **Marassi, F. M., C. Ma, H. Gratkowski, S. K. Straus, K. Strebel, M. Oblatt-Montal, M. Montal, and S. J. Opella.** 1999. Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14336-41.
 208. **Margottin, F., S. Benichou, H. Durand, V. Richard, L. X. Liu, E. Gomas, and R. Benarous.** 1996. Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation. *Virology* 223:381-6.
 209. **Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1:565-74.
 210. **Mariani, R., F. Kirchhoff, T. C. Greenough, J. L. Sullivan, R. C. Desrosiers, and J. Skowronski.** 1996. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 70:7752-64.
 211. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9:1398-403.
 212. **Martin-Serrano, J., and P. D. Bieniasz.** 2003. A bipartite late-budding domain in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77:12373-7.
 213. **Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz.** 2004. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* 78:5554-63.
 214. **Massiah, M. A., M. R. Starich, C. Paschall, M. F. Summers, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* 244:198-223.
 215. **Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 305:1431-8.
 216. **McCormick-Davis, C., S. B. Dalton, D. K. Singh, and E. B. Stephens.** 2000. Comparison of Vpu sequences from diverse geographical isolates of HIV type 1

- identifies the presence of highly variable domains, additional invariant amino acids, and a signature sequence motif common to subtype C isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1089-95.
217. **Melamed, D., M. Mark-Danieli, M. Kenan-Eichler, O. Kraus, A. Castiel, N. Laham, T. Pupko, F. Glaser, N. Ben-Tal, and E. Bacharach.** 2004. The conserved carboxy terminus of the capsid domain of human immunodeficiency virus type 1 gag protein is important for virion assembly and release. *J Virol* 78:9675-88.
 218. **Meusser, B., and T. Sommer.** 2004. Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation. *Mol Cell* 14:247-58.
 219. **Meyer, B. E., J. L. Meinkoth, and M. H. Malim.** 1996. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J Virol* 70:2350-9.
 220. **Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-90.
 221. **Morellet, N., S. Bouaziz, P. Petitjean, and B. P. Roques.** 2003. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol* 327:215-27.
 222. **Morgado, M. G., E. C. Sabino, E. G. Shpaer, V. Bongertz, L. Brigido, M. D. Guimaraes, E. A. Castilho, B. Galvao-Castro, J. I. Mullins, R. M. Hendry, and et al.** 1994. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:569-76.
 223. **Morikawa, Y., D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones.** 2000. Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J Virol* 74:16-23.
 224. **Morikawa, Y., W. H. Zhang, D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones.** 1998. Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. *J Virol* 72:7659-63.
 225. **Mous, J., E. P. Heimer, and S. F. Le Grice.** 1988. Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type I polyprotein in *Escherichia coli*. *J Virol* 62:1433-6.
 226. **Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky, and D. J. Capon.** 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450-8.
 227. **Muller, B., U. Tessmer, U. Schubert, and H. G. Krausslich.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol* 74:9727-31.
 228. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* 74:3548-54.
 229. **Muthumani, K., D. S. Hwang, B. M. Desai, D. Zhang, N. Dayes, D. R. Green, and D. B. Weiner.** 2002. HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 277:37820-31.
 230. **Navia, B. A., B. D. Jordan, and R. W. Price.** 1986. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol* 19:517-24.
 231. **Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2:e39.

232. **Nkengasong, J. N., C. Adje-Toure, and P. J. Weidle.** 2004. HIV antiretroviral drug resistance in Africa. *AIDS Rev* 6:4-12.
233. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4:902-10.
234. **O'Brien, W. A., Y. Koyanagi, A. Namazie, J. Q. Zhao, A. Diagne, K. Idler, J. A. Zack, and I. S. Chen.** 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348:69-73.
235. **Ohagen, A., and D. Gabuzda.** 2000. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 74:11055-66.
236. **Ono, A., D. Demirov, and E. O. Freed.** 2000. Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J Virol* 74:5142-50.
237. **Ono, A., J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2000. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* 74:2855-66.
238. **Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* 62:2578-86.
239. **Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert.** 2000. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 278:111-21.
240. **Pacyniak, E., M. L. Gomez, L. M. Gomez, E. R. Mulcahy, M. Jackson, D. R. Hout, B. J. Wisdom, and E. B. Stephens.** 2005. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:379-94.
241. **Pahl, H. L.** 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-66.
242. **Pantaleo, G., and A. S. Fauci.** 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 13:487-512.
243. **Pante, N., and M. Kann.** 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13:425-34.
244. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162:443-55.
245. **Perez-Caballero, D., T. Hatzioannou, J. Martin-Serrano, and P. D. Bieniasz.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions. *J Virol* 78:9560-3.
246. **Perlman, M., and M. D. Resh.** 2006. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* 7:731-45.
247. **Pessin, J. E., and M. Glaser.** 1980. Budding of Rous sarcoma virus and vesicular stomatitis virus from localized lipid regions in the plasma membrane of chicken embryo fibroblasts. *J Biol Chem* 255:9044-50.
248. **Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed.** 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol* 75:7175-83.
249. **Pollard, V. W., and M. H. Malim.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.
250. **Poon, B., J. B. Jowett, S. A. Stewart, R. W. Armstrong, G. M. Rishton, and I. S. Chen.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard. *J Virol* 71:3961-71.

251. **Poon, D. T., L. V. Coren, and D. E. Ott.** 2000. Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging. *J Virol* 74:3918-23.
252. **Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, and M. Bukrinsky.** 1998. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 273:13347-52.
253. **Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky.** 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17:909-17.
254. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
255. **Pornillos, O., D. S. Higginson, K. M. Stray, R. D. Fisher, J. E. Garrus, M. Payne, G. P. He, H. E. Wang, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 162:425-34.
256. **Potts, K. E., M. L. Kalish, T. Lott, G. Orloff, C. C. Luo, M. A. Bernard, C. B. Alves, R. Badaro, J. Suleiman, O. Ferreira, and et al.** 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *Aids* 7:1191-7.
257. **Raha, T., S. W. Cheng, and M. R. Green.** 2005. HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. *PLoS Biol* 3:e44.
258. **Raney, A., L. S. Kuo, L. L. Baugh, J. L. Foster, and J. V. Garcia.** 2005. Reconstitution and molecular analysis of an active human immunodeficiency virus type 1 Nef/p21-activated kinase 2 complex. *J Virol* 79:12732-41.
259. **Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze.** 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 3:718-29.
260. **Re, F., D. Braaten, E. K. Franke, and J. Luban.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 69:6859-64.
261. **Reil, H., A. A. Bukovsky, H. R. Gelderblom, and H. G. Gottlinger.** 1998. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *Embo J* 17:2699-708.
262. **Resh, M. D.** 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* 7:84-91.
263. **Robertson DL, A. J., Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B.** 1999. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences *In* L. A. N. Laboratory (ed.), *Human retroviruses and AIDS 1999*, Los Alamos, NM.
264. **Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, M. L. Kalish, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. Salminen, P. M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288:55-6.
265. **Roebuck, K. A., and M. Saifuddin.** 1999. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr* 8:67-84.
266. **Roeth, J. F., and K. L. Collins.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:548-63.

267. **Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:2071-5.
268. **Roshal, M., B. Kim, Y. Zhu, P. Nghiem, and V. Planelles.** 2003. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem* **278**:25879-86.
269. **Ross, T. M., A. E. Oran, and B. R. Cullen.** 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* **9**:613-21.
270. **Roth, M. J., P. L. Schwartzberg, and S. P. Goff.** 1989. Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence. *Cell* **58**:47-54.
271. **Safai, B., D. A. Lowenthal, and B. Koziner.** 1987. Malignant neoplasms associated with the HTLV-III/LAV infection. *Antibiot Chemother* **38**:80-98.
272. **Sakai, H., K. Tokunaga, M. Kawamura, and A. Adachi.** 1995. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J Gen Virol* **76** (Pt 11):2717-22.
273. **Schafer, A., H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 2004. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* **328**:163-8.
274. **Schindler, M., S. Wurfl, P. Benaroch, T. C. Greenough, R. Daniels, P. Easterbrook, M. Brenner, J. Munch, and F. Kirchhoff.** 2003. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol* **77**:10548-56.
275. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
276. **Schubert, U., L. C. Anton, I. Bacik, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orlowski, K. Strebel, and J. W. Yewdell.** 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* **72**:2280-8.
277. **Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarell, and K. Strebel.** 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**:809-19.
278. **Schubert, U., K. A. Clouse, and K. Strebel.** 1995. Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes. *J Virol* **69**:7699-711.
279. **Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Henklein, K. Strebel, and M. Montal.** 1996. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* **398**:12-8.
280. **Schubert, U., P. Henklein, B. Boldyreff, E. Wingender, K. Strebel, and T. Porstmann.** 1994. The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted alpha-helix-turn-alpha-helix-motif. *J Mol Biol* **236**:16-25.
281. **Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H. G. Krausslich, and J. W. Yewdell.** 2000.

- Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13057-62.
282. **Schubert, U., T. Schneider, P. Henklein, K. Hoffmann, E. Berthold, H. Hauser, G. Pauli, and T. Porstmann.** 1992. Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II. *Eur J Biochem* **204**:875-83.
 283. **Schubert, U., and K. Strebel.** 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J Virol* **68**:2260-71.
 284. **Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**:338-42.
 285. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* **64**:5448-56.
 286. **Segura-Totten, M., and K. L. Wilson.** 2001. Virology. HIV--breaking the rules for nuclear entry. *Science* **294**:1016-7.
 287. **Shanklin, J., M. Jabben, and R. D. Vierstra.** 1987. Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:359-363.
 288. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-7.
 289. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785-801.
 290. **Simon, J. H., and M. H. Malim.** 1996. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J Virol* **70**:5297-305.
 291. **Simon, V., D. D. Ho, and Q. Abdool Karim.** 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**:489-504.
 292. **Singh, D. K., D. M. Griffin, E. Pacyniak, M. Jackson, M. J. Werle, B. Wisdom, F. Sun, D. R. Hout, D. M. Pinson, R. S. Gunderson, M. F. Powers, S. W. Wong, and E. B. Stephens.** 2003. The presence of the casein kinase II phosphorylation sites of Vpu enhances the CD4(+) T cell loss caused by the simian-human immunodeficiency virus SHIV(KU-1bMC33) in pig-tailed macaques. *Virology* **313**:435-51.
 293. **Singh, D. K., C. McCormick, E. Pacyniak, K. Lawrence, S. B. Dalton, D. M. Pinson, F. Sun, N. E. Berman, M. Calvert, R. S. Gunderson, S. W. Wong, and E. B. Stephens.** 2001. A simian human immunodeficiency virus with a nonfunctional Vpu (deltavpuSHIV(KU-1bMC33)) isolated from a macaque with neuroAIDS has selected for mutations in env and nef that contributed to its pathogenic phenotype. *Virology* **282**:123-40.
 294. **Spearman, P., J. J. Wang, N. Vander Heyden, and L. Ratner.** 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol* **68**:3232-42.
 295. **Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**:591-601.
 296. **Stopak, K., and W. C. Greene.** 2005. Protecting APOBEC3G: a potential new target for HIV drug discovery. *Curr Opin Investig Drugs* **6**:141-7.

297. **Stove, V., I. Van de Walle, E. Naessens, E. Coene, C. Stove, J. Plum, and B. Verhasselt.** 2005. Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alphabeta. *J Virol* **79**:11422-33.
298. **Strack, B., A. Calistri, M. A. Accola, G. Palu, and H. G. Gottlinger.** 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13063-8.
299. **Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689-99.
300. **Strack, B., A. Calistri, and H. G. Gottlinger.** 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol* **76**:5472-9.
301. **Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-30.
302. **Strebel, K., T. Klimkait, and M. A. Martin.** 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**:1221-3.
303. **Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2004. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* **279**:36059-71.
304. **Swigut, T., N. Shohdy, and J. Skowronski.** 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *Embo J* **20**:1593-604.
305. **Tanaka, M., T. Ueno, T. Nakahara, K. Sasaki, A. Ishimoto, and H. Sakai.** 2003. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology* **311**:316-25.
306. **Tang, C., E. Loeliger, P. Luncsford, I. Kinde, D. Beckett, and M. F. Summers.** 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:517-22.
307. **Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5163-7.
308. **Tiganos, E., J. Friborg, B. Allain, N. G. Daniel, X. J. Yao, and E. A. Cohen.** 1998. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology* **251**:96-107.
309. **Tiganos, E., X. J. Yao, J. Friborg, N. Daniel, and E. A. Cohen.** 1997. Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J Virol* **71**:4452-60.
310. **Tiley, L. S., M. H. Malim, H. K. Tewary, P. G. Stockley, and B. R. Cullen.** 1992. Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:758-62.
311. **Tobiume, M., M. Takahoko, T. Yamada, M. Tatsumi, A. Iwamoto, and M. Matsuda.** 2002. Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *J Virol* **76**:5959-65.
312. **Towers, G. J., T. Hatzioannou, S. Cowan, S. P. Goff, J. Luban, and P. D. Bieniasz.** 2003. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* **9**:1138-43.
313. **UNAIDS/WHO.** 2006. Overview of the global AIDS epidemic.
314. **Varthakavi, V., R. M. Smith, S. P. Bour, K. Strebel, and P. Spearman.** 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15154-9.

315. **Varthakavi, V., R. M. Smith, K. L. Martin, A. Derdowski, L. A. Lapierre, J. R. Goldenring, and P. Spearman.** 2006. The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release. *Traffic* 7:298-307.
316. **VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter.** 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7724-9.
317. **von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono.** 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6992-6.
318. **von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol* 67:4945-55.
319. **von Schwedler, U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H. E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimbora, A. Scott, H. G. Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, and W. I. Sundquist.** 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114:701-13.
320. **Wang, J. K., E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono.** 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:394-9.
321. **Weissman, A. M.** 1997. Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today* 18:189-98.
322. **Wildum, S., M. Schindler, J. Munch, and F. Kirchhoff.** 2006. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol* 80:8047-59.
323. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66:7193-200.
324. **Wray, V., T. Federau, P. Henklein, S. Klabunde, O. Kunert, D. Schomburg, and U. Schubert.** 1995. Solution structure of the hydrophilic region of HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) by CD and 1H NMR spectroscopy. *Int J Pept Protein Res* 45:35-43.
325. **Wray, V., R. Kinder, T. Federau, P. Henklein, B. Bechinger, and U. Schubert.** 1999. Solution structure and orientation of the transmembrane anchor domain of the HIV-1-encoded virus protein U by high-resolution and solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* 38:5272-82.
326. **Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken.** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 74:9381-7.
327. **Yao, X. J., J. Friborg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R. P. Sekaly, and E. A. Cohen.** 1995. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* 209:615-23.
328. **Yao, X. J., S. Garzon, F. Boisvert, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1993. The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6:135-41.
329. **Yao, X. J., H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J Virol* 66:5119-26.

330. **Yao, X. J., R. A. Subbramanian, N. Rougeau, F. Boisvert, D. Bergeron, and E. A. Cohen.** 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* **69**:7032-44.
331. **Yu, Q., R. Konig, S. Pillai, K. Chiles, M. Kearney, S. Palmer, D. Richman, J. M. Coffin, and N. R. Landau.** 2004. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* **11**:435-42.
332. **Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* **66**:4966-71.
333. **Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J Virol* **67**:213-21.
334. **Zennou, V., D. Perez-Caballero, H. Gottlinger, and P. D. Bieniasz.** 2004. APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **78**:12058-61.
335. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
336. **Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.